



**Les inhibiteurs "suicides" des Cytochromes P450:
Etablissement d'une banque de données, mise au point
d'un test de screening et étudesstructures-activité
concernant des substrats furaniques du CYP 3A4.**

Elena Fontana

► **To cite this version:**

Elena Fontana. Les inhibiteurs "suicides" des Cytochromes P450: Etablissement d'une banque de données, mise au point d'un test de screening et étudesstructures-activité concernant des substrats furaniques du CYP 3A4.. Sciences pharmaceutiques. Université René Descartes - Paris V, 2005. Français. <tel-00069723>

HAL Id: tel-00069723

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00069723>

Submitted on 19 May 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université René Descartes - PARIS 5
UFR Biomédicale
ECOLE DOCTORALE DU MEDICAMENT

ANNÉE: 2005

n°

THÈSE

Présentée

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 5

par

Elena FONTANA

**Les inhibiteurs "suicides" des Cytochromes P450: Etablissement d'une
banque de données, mise au point d'un test de screening et études
structures-activité concernant des substrats furaniques du CYP 3A4.**

Soutenue le : 21 Novembre 2005

Jury : Prof. Philippe Beaune – Examineur

Prof. Antoinette Chougnet – Rapporteur externe

Dr. Jean-Pierre Salaun – Rapporteur externe

Dr. Patrick M. Dansette – Directeur de Thèse

Dr. Sonia M. Poli – Codirecteur de Thèse

Remerciements:

Pendant les trois années de thèse passées chez Roche, j'ai rencontré un grand nombre de personnes qui m'ont beaucoup apporté scientifiquement et humainement.

Je tiens ici à les remercier :

Patrick Dansette et Sonia Poli, directeur et codirecteur de cette thèse, pour leur confiance, leur patience et pour leur fondamental apport scientifique ;

Philippe Coassolo, responsable du département de DMPK, pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse ;

Prof Anoinette Chougnet et Dr Jean-Pierre Salaun, qui ont accepté de lire ce long manuscrit et d'en être les rapporteurs ;

le group de DMPK chez Roche-Basel, pour m'avoir accueilli chaleureusement et pour leur important soutien technique et humain, en particulier V. Bona ;

les chimistes qui ont synthétisé et gentiment fourni les molécules utilisés dans ce travail de thèse ;

tout ceux qui, avec leur différents apports, ont permis que la thèse se déroule aussi bien, en me permettant de travailler dans un environnement amical et chaleureux.

Abréviations	6
1. Introduction	9
1.1 Destin des xénobiotiques	10
1.1.a ADME	10
1.1.b Réactions de Phase I et de Phase II	12
1.1.c Les enzymes responsables des réactions de Phase I	17
1.2 Rôles des Cytochromes P450	21
1.2.a Biosynthèse de composés endogènes	22
1.2.b Catalyse des réactions sur les composés exogènes (xénobiotiques)	23
1.3 Fonctionnement des Cytochromes P450	28
1.3.a Considérations structurales et cycle catalytique	28
1.3.b Chaîne de transfert des électrons	32
1.4 Classification des Cytochromes P450	33
1.4.a Classification générale des Cytochromes P450	33
1.4.b Les familles des Cytochromes P450 humains	34
1.4.c Le Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)	38
1.5 Inhibition des Cytochromes P450	41
1.5.a Inhibition réversible	42
1.5.b Inhibition irréversible	44
1.6 Rôle de l'inhibition des Cytochromes P450 dans le métabolisme des médicaments	47
1.6.a Cytochromes P450 et interactions médicamenteuses : l'induction	48
1.6.b Cytochromes P450 et interactions médicamenteuses : l'inhibition	49
1.6.c Cytochromes P450 et interactions médicamenteuses : l'inhibition suicide	51
1.7 Objectifs de ce travail	53
2. Revue de Littérature sur les Inhibiteurs Suicides [Mechanism-Based Inhibitors (MBI)]	54
2.1. But de la revue et de la base de données	55
2.2. Recherche de littérature	56
2.3. Présentation de la base de données	58
2.4. Discussion	65
2.5. Publication	67
3. Nouvelle Méthode pour Détecter l'Inhibition Dépendant du Temps (Time Dependent Inhibition ou TDI)	110
3.1 Introduction	111
3.2 Méthode fluorimétrique pour la détermination de l'IC50	112

3.2.a Description de la méthode publiée par Crespi	112
3.2.b Méthode pour la détermination de l'IC ₅₀ utilisé dans cette thèse	113
3.2.c Validation de la méthode de détermination de l'IC ₅₀ et statistiques.....	117
3.3 Méthode de détermination de l'inhibition en fonction du temps de pré-incubation (Time Dependent Inhibition)	120
3.4 Méthode pour la détermination de l'inhibition dépendant du temps (TDI) en suivant « on-line » la cinétique d'inactivation	125
3.4.a Validation de la méthode	129
3.5 Comparaison entre les deux méthodes de détermination de la TDI : avec pré-incubation et par suivi de la cinétique d'inactivation.....	133
4. Application de la stratégie pour diminuer les risques d'interactions médicamenteuses à un projet de recherche: les antagonistes pour le récepteur A_{2a} pour l'adénosine	135
4.1 Études préliminaires	137
4.1.a Détermination de l'IC ₅₀ sur cinq isoformes de Cytochromes P450	137
4.1.b Détermination de l'inhibition dépendant du temps (TDI)	139
4.1.c Détermination de la TDI en présence de GSH	143
4.1.d Détermination de la TDI en présence de kétoconazole	144
4.2 Études avec les dérivés radioactifs des composés	145
4.2.a Détermination de la liaison covalente aux cytochromes P450	145
4.2.b Détermination de la stœchiométrie de liaison au CYP3A4	146
4.2.c Détermination du rapport de partition (partition ratio)	148
4.3 Caractérisation des métabolites des deux inhibiteurs suicides	151
4.4 Application de la nouvelle méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps (TDI) pour une étude de relations structure-activité (SAR)	163
5. Discussion	168
5.1 Revue de littérature	169
5.2 Nouvelle méthode de détermination de l'inhibition dépendant du temps (TDI).....	172
5.3 Études sur deux composés Roche et leur activité comme inhibiteurs suicides	176
6. Conclusions	180
7. Partie expérimentale	185
7.1. Matériels et instruments	186
7.1.a Réactifs chimiques et enzymes	186
7.1.b Appareils	187
7.2. Test pour la détermination de l'IC ₅₀	187
7.2.a Préparation des réactifs	187
7.2.b Préparation de la microplaque	188
7.2.c Calculs sur les données	189

7.3 Méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps TDI ou Time-Dependent Inhibition)	190
7.3.a Préparation de la plaque	190
7.3.b Pré-incubation	192
7.3.c Mesure de l'activité enzymatique résiduelle	193
7.3.d Calculs sur les données	193
7.4 Méthode pour la détermination de la (TDI) en présence de GSH	194
7.5 Test pour la détermination de la TDI en présence de kétoconazole	195
7.6 Incubation pour la détermination de la liaison covalente aux cytochromes P450	196
7.7 Incubation pour la détermination de la stœchiométrie de liaison	199
7.7.a Calculs sur les données	200
7.8 Incubations pour la détermination du rapport de partition	200
7.8.a Calculs sur les données	200
7.9 Incubations pour l'identification des métabolites via LC-MS/MS (1).....	202
7.9.a Préparation des réactifs	202
7.9.b Préparation de la plaque	202
7.9.c Incubation	203
7.9.d Analyse des échantillons	204
7.10 Incubations pour l'identification des métabolites via LC-MS/MS (2).....	204
7.10.a Incubation avec CYP3A4 en présence de GSH.....	204
7.10.b Incubation avec microsomes de rat en présence de GSH.....	204
7.10.c Analyse des échantillons.....	205
8. Bibliographie	207

Abréviations

A _{2a}	Récepteur A _{2a} pour l'adénosine
ADME	Ensemble des processus d'Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMMC	3-(2-(N,N-diethyl)-N-methylamino(ethyl)-7-methoxy-4)-methylcoumarine
AMP	Adénine Mono Phosphate
As	Arsénique
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BFC	7-benzyloxy-4-(trifluorométhyl)-coumarine
BzRes	Resorufin benzyle éther
Ca ²⁺	Calcium
CEC	3-cyano-7-ethoxy coumarine
Cl	Chlore
CoASH	Coenzyme A
C _{TOT}	Concentration totale du médicament dans l'organisme
CYP	Cytochrome P450
Cys	Cystéine
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
E	Enzyme
EI	Complexe enzyme-inhibiteur
EI*	Complexe enzyme-inhibiteur activé
EI'	Complexe irréversible enzyme-inhibiteur
ER	Réticulum Endoplasmique
ES	Complexe enzyme-substrat
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
Fe ²⁺	Ion Fer
Fe ³⁺	Ion Fer
FMN	Flavine Mono Nucléotide
FMO	Flavine Mono Oxygénase
G ₆ P	Glucose 6-phosphate
G ₆ PDH	Glucose 6-phosphate dehydrogenase
Gly	Glycine
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S- tranferase
Hg	Mercure

Abréviations

HLM	Microsomes de foie humain (Human Liver Microsomes)
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
I	Inhibiteur
[I]	Concentration d'inhibiteur
i.v.	Voie d'administration intraveineuse
IC ₅₀	Concentration d'inhibiteur nécessaire pour obtenir le 50% d'inhibition
K ⁺	Potassium
k _{cat}	Constante cinétique de production du métabolite
K _i	Constante d'inhibition
K _I	Constante d'inhibition suicide
k _{inact}	Vitesse maximale de la réaction d'inhibition suicide
K _m	Constante de Michaelis-Menten
k _{obs}	Vitesse de la réaction d'inactivation à chaque temps
LC	Chromatographie liquide
anti-LKM2	Anticorps contre les microsomes de foie et rein (liver-kidney microsomes)
λ _{em}	Longueur d'onde d'émission
λ _{ex}	Longueur d'onde d'excitation
MDZ	Midazolam
MeOH	Méthanol
MFC	4-trifluorométhyl 7-méthoxy coumarine
Mg ²⁺	Magnésium
MIC	Complexe intermédiaire stable avec le métabolite (Metabolite-Intermediate Complex)
MS	Spectrométrie de masse
Na ⁺	Sodium
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydraté
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydraté
P	Rapport de partition (Partition ratio)
p.o.	Voie d'administration par oral
PAP	Phosphoadénosine-5'-phosphate
PAPS	Phosphoadénosine-5'-phosphosulphate
pH	Potentiel hydrogène
PMID	Pub Med ID number
PXR	Pregnane Xenobiotic Receptor
Q _{TOT}	Quantité totale de médicament dans l'organisme
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

Abréviations

SAR	Relations structure-activité (Structure-Activity Relationships)
Se	Sélénium
SNC	Système nerveux central
$t_{1/2}$	Temps de demie vie
TAO	Troléandomycin
TDI	Inhibition Dépendent du Temps (Time-Dependent Inhibition)
UDP	Uridine Di Phosphate
UDPGA	Uridine Di Phosphate-Glucuronic Acid
UV	Ultra Violet
V_d	Volume apparent de distribution
V_{max}	Vitesse maximale
XD	Xanthine Dehydrogénase
XO	Xanthine Oxydase
Zn^{2+}	Zinc

1. Introduction

1. Introduction

1.1 Destin des xénobiotiques

1.1.a ADME

Tout composé exogène (xénobiotique) qui rentre dans le corps humain ou animal, subit les phases d’Absorption, de Distribution, de Métabolisme et d’Excrétion (ADME). Au cours de la recherche et du développement des nouveaux médicaments, il faut tenir compte de tous les processus que le nouveau médicament (dans une formulation spécifique) subira après administration aux patients. La discipline qui étudie les processus d’ADME est la pharmacocinétique : elle s’occupe de décrire le devenir d’un médicament au cours du temps, à travers le suivi de sa concentration dans l’organisme, depuis son administration jusqu’à son élimination. Lors de l’instauration d’un traitement médicamenteux, les objectifs sont d’obtenir une concentration de composé actif au niveau de la cible thérapeutique suffisante pour obtenir l’effet thérapeutique de durée et d’intensité désirées, mais qui soit assez faible pour éviter ou réduire les effets secondaires liés à un surdosage. En fait, l’obtention d’un effet thérapeutique est liée à la concentration de la substance active (le médicament lui-même ou un métabolite) dans la circulation sanguine et au niveau du site actif. La concentration du composé actif dans l’organisme détermine aussi l’apparition des effets secondaires, qui dépendent aussi de la concentration en molécule active au niveau d’autres récepteurs, différentes de la cible thérapeutique ; la liaison de ces récepteurs avec un composé exogène (agoniste ou antagoniste) peut provoquer des effets secondaires non désirés.

Les étapes du processus de pharmacocinétique sont les suivantes :

1) Absorption (ou résorption) : la phase d’administration au patient d’une molécule active et son passage dans la circulation sanguine. Le temps nécessaire pour accomplir ce passage dépend surtout de la voie d’administration utilisée et de la formulation du médicament. L’absorption est instantanée pour l’administration intraveineuse (i.v.), car on injecte une solution du principe actif directement dans le circuit sanguin, elle nécessite d’un temps plus long pour l’injection intramusculaire ou sous-cutanée, et encore plus long pour la voie orale, qui est la voie d’administration la plus utilisée. Il y a des voies d’administration moins utilisées, mais bien connues et qui ont montré leur efficacité dans des cas particuliers. Des exemples de ces voies d’administration sont :

- * la voie sub-linguale, utilisée, par exemple, pour des anesthésiques locaux (Bergman, 1969), pour un médicament anti-inflammatoire comme le diclofénac (Cassidy, 1993), ou pour un dérivé hormonal comme le misoprostol (Wolf, 2005) ;
- * la voie rectale ;
- * l'inhalation nasale, utilisée, par exemple, pour les médicaments antiasthmatiques ; cette voie est aussi utilisée pour l'assomption de drogues récréatives comme la cocaïne (Bromley, 1988) ;
- * l'absorption à travers de la peau (libération trans-dermique) est très efficace, par exemple, pour l'administration de la nitroglycérine aux patients avec insuffisance cardiaque (Davidov, 1981).

2) Distribution : le passage de la molécule active du compartiment central (système circulatoire) aux tissus, et par conséquent à la cible thérapeutique. La distribution du médicament peut être uniforme dans tous les tissus, mais dans certains cas on observe une accumulation des composés dans certains organes, comme par exemple l'accumulation de molécules lipophiles dans les organes plus riches en lipides (comme le foie et la moelle) et dans le tissu adipeux ; des exemples de médicaments lipophiles, qui s'accumulent dans les tissus riches en graisse, sont l'amiodarone, un médicament contre l'arythmie (Hosaka, 2002), et la cyclosporine, utilisé contre le rejet après les transplantations d'organes (Akhlaghi, 2002).

Le paramètre qui décrit la phase de distribution d'un xénobiotique dans l'organisme humain est le V_d , c'est-à-dire le volume apparent de distribution. Par définition, V_d est le volume de liquide biologique nécessaire pour contenir le principe actif à une concentration égale à celle présente dans le plasma. Il peut aussi être interprété comme le rapport entre la quantité totale de médicament présente dans l'organisme (Q_{tot}) et sa concentration plasmatique (C_{tot}) dans un état d'équilibre : $V_d = Q_{tot} / C_{tot}$. Donc ce paramètre fournit des informations sur la distribution du principe actif dans l'organisme (Riegelman, 1968).

3) Métabolisme : toutes les transformations chimiques que la molécule subit par action des enzymes métaboliques présentes dans les différents tissus. Le foie est l'organe le plus riche en enzymes métaboliques, mais on en retrouve dans tous les tissus, de la peau à l'épithélium intestinal, aux poumons, aux reins, aux muqueuses des voies respiratoires. Les réactions métaboliques sont classées en réactions de phase 0 de phase I et de phase II.

On appelle phase 0 du métabolisme le passage des molécules de la circulation sanguine aux hépatocytes.

Les réactions de phase I sont celles concernant la modification directe de la structure chimique du xénobiotique, comme par exemple, les oxydations, les réductions, les déalkylations.

Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison du composé parent ou de ses métabolites avec des molécules endogènes pour les rendre plus hydrosolubles : la glucuronidation, la sulfatation, la conjugaison avec des petits acides aminés (glycine principalement) et avec le glutathion (GSH).

4) Excrétion : la sortie des métabolites du xénobiotique ou du composé parent non modifié de l'organisme. L'excrétion des métabolites différents peut avoir lieu par des voies différentes ou, plus souvent, le même métabolite est excrété par plusieurs voies, comme par exemple la voie rénale, la voie biliaire et intestinale, la voie cutanée.

Le but ultime des études pharmacocinétiques est la définition d'un schéma thérapeutique (dose à administrer et fréquence d'administration) adapté aux caractéristiques du composé actif, au mode d'administration et aux besoins du malade. Pour définir la pharmacocinétique d'un médicament dans l'organisme, les différentes étapes de son devenir (ADME) doivent être quantifiées. Les paramètres spécifiques à chaque étape sont calculés à partir des concentrations du médicament dans le plasma, le sang, les urines et les fèces. À partir des valeurs de concentration obtenues au cours du temps, on essaie de construire pour chaque nouvelle molécule thérapeutique, un modèle d'ADME constitué de différents compartiments (sang, organes, tissus) dans lesquels le médicament se distribue et diffuse de l'un à l'autre (figure 1.1).

1.1.b Réactions de Phase I et de Phase II

Les réactions de phase I comportent généralement l'introduction d'un groupe hydroxyle (-OH) sur le composé parent. Mais la métabolisation d'une molécule peut aussi découvrir des groupements hydrophiles, comme l'amine primaire (-NH₂), le sulfhydryle (-SH), le carboxyle (-COOH), déjà présents sous une forme masquée sur le composé parent.

Le but des réactions de métabolisme est de rendre les composés exogènes plus hydrosolubles, pour favoriser leur élimination de l'organisme. Les réactions de phase I, par introduction ou exposition des groupements hydrophiles, provoquent une augmentation de la solubilité des composés en phase aqueuse qui favorise leur élimination. La solubilité des xénobiotiques est encore augmentée si en plus ils subissent aussi une réaction de phase II, c'est-à-dire la conjugaison avec des molécules endogènes très hydrophiles, comme par exemple l'acide glucuronique. Les réactions de phase II peuvent avoir lieu sur les métabolites de phase I ou sur les xénobiotiques non modifiés, si leur structure chimique le permet.

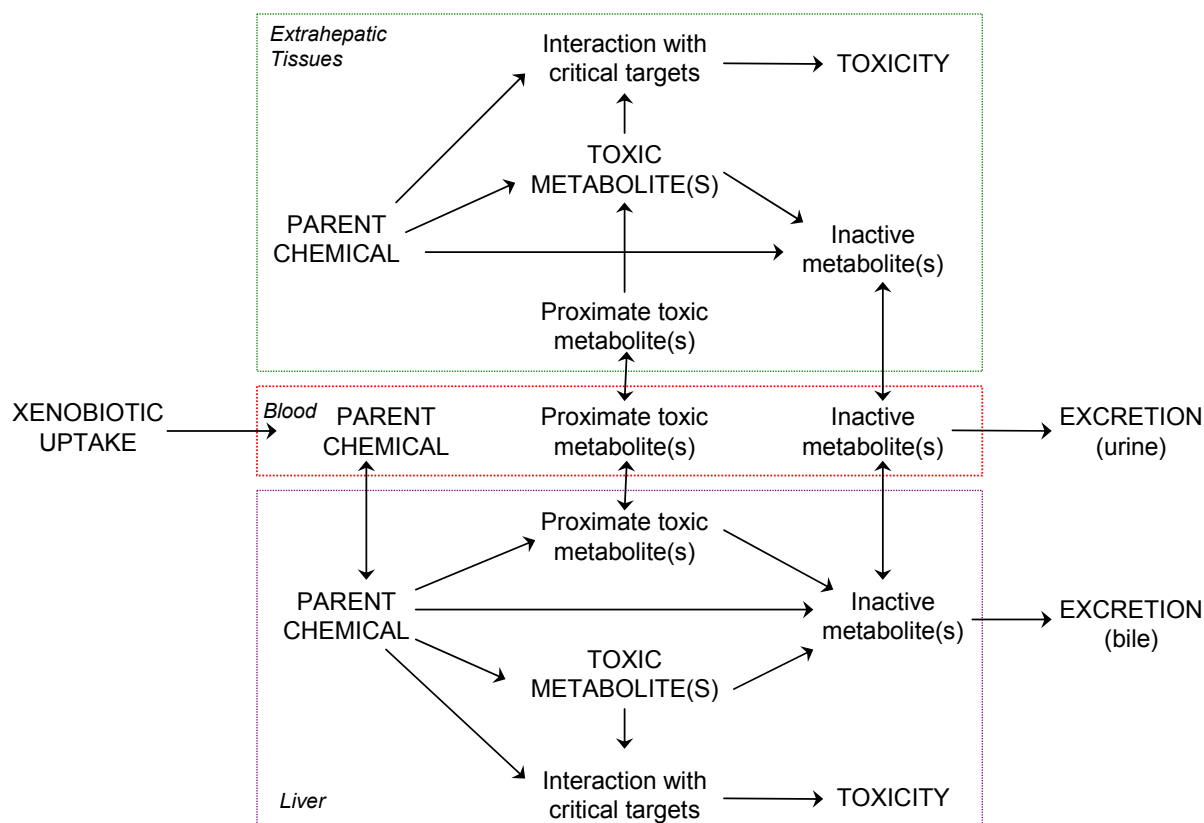


Figure 1.1 : Représentation schématique du destin d'un xénobiotique après absorption dans l'organisme. Les biotransformations des composés lipophiles peuvent produire des métabolites plus hydrosolubles et dont l'élimination est favorisée. Mais les produits peuvent être aussi des composés toxiques pour le foie ou pour des autres organes (Vermeulen, 1996).

Les réactions fondamentales de phase I sont les suivantes :

- * Oxydations
 - Mono-oxydations microsomales ;
 - Oxydations cytosoliques et mitochondriales ;
 - Co-oxydations effectuées par l'enzyme prostaglandine synthétase ;
- * Réductions ;
- * Réactions d'hydrolyse.

Des exemples des réactions de phase I sont illustrés en figure 1.2.

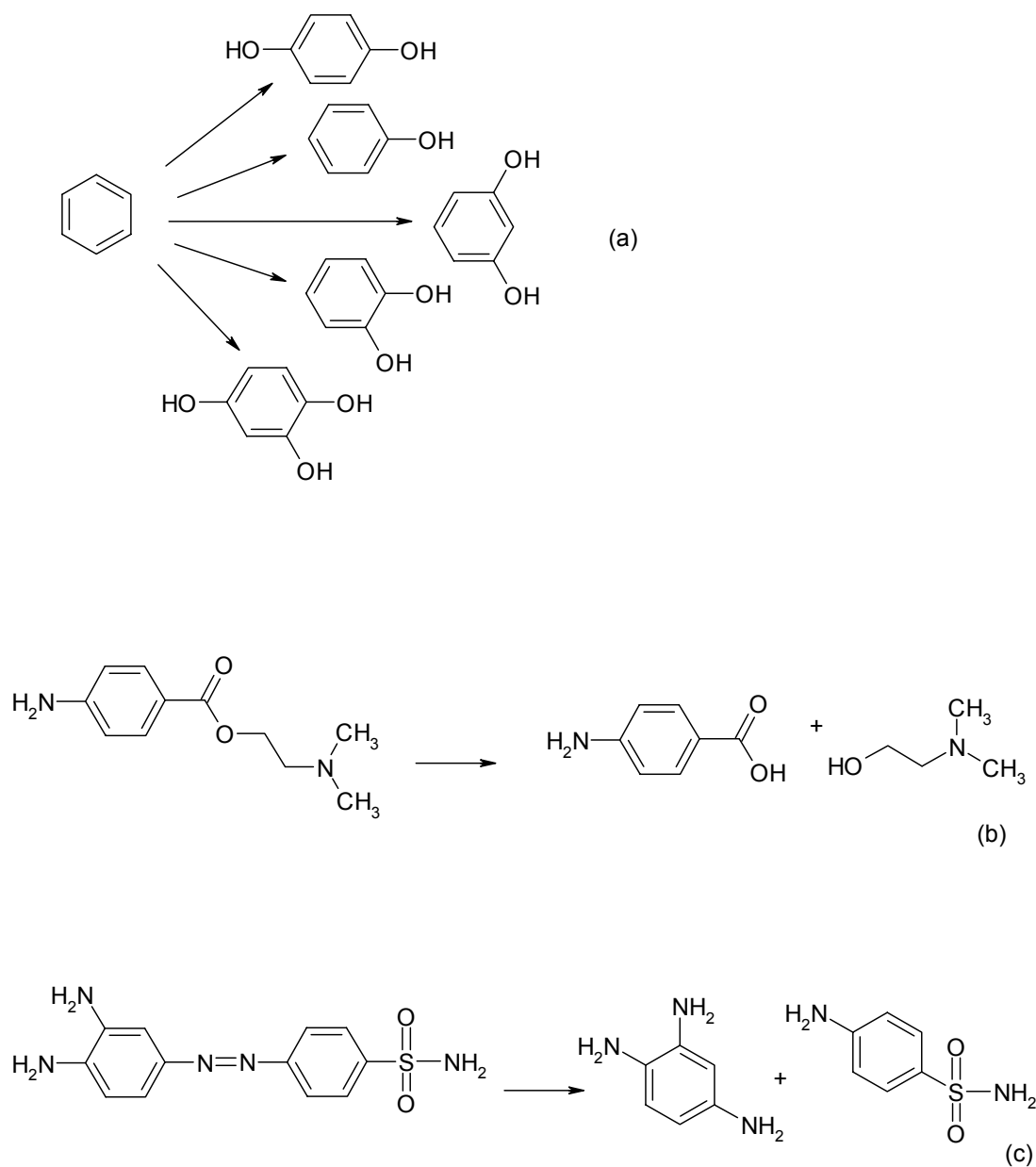


Figure 1.2: Trois exemples de réactions métaboliques de phase I. (a) Différents produits possibles d'oxydation du benzène ; (b) réaction d'hydrolyse d'un ester, dans la molécule de la procaine ; (c) réaction de réduction de la double liaison azote-azote de la molécule du prontosil, qui donne comme produits deux amines primaires (Gingell, 1973).

Les enzymes responsables des réactions de phase I sont principalement les Cytochromes P450, qui réalisent la plus part des réactions d'oxydation ; pourtant, ils sont aussi capables de réduire des substrats et d'effectuer plusieurs réactions moins communes. Les flavine monooxygénases (flavin-containing mono-oxygenases, FMO) sont aussi des enzymes de phase I localisés, comme les cytochromes P450, dans le réticulum endoplasmique (ER) des cellules.

Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison des produits des réactions de phase I, ou des composés parents, avec des molécules endogènes hydrophiles.

Les réactions de phase II sont les suivantes :

- * Glucuronidation ;
- * Conjugaison avec un groupe sulfate ;
- * Acétylation ;
- * Méthylation ;
- * Conjugaison avec le glutathion (GSH) ;
- * Conjugaison avec des acides aminés.

Les principales réactions de phase II sont représentées en figure 1.3.

Sauf la glucuronidation, dont les enzymes catalytiques sont situés sur les microsomes, les réactions de phase II ont toutes lieu dans le cytoplasme cellulaire.

- * La glucuronidation est la principale réaction de conjugaison ; elle implique la présence d'un co-facteur, l'UDPGA (acide uridine glucuronique diphosphate). Le transfert de l'acide glucuronique de l'UDPGA aux groupements du substrat comme $-OH$ et $-COOH$, aux atomes d'azote et soufre et occasionnellement aux atomes de carbone, est effectué par les membres de la famille d'enzymes UDP-glucuronosyl transférases (UGT). A présent, 52 isoformes de UGT ont été identifiés chez les vertébrés, dont 15 isoformes chez l'homme (Tukey, 2000 ; Zhou J., 2005). Les produits conjugués avec l'acide glucuronique sont beaucoup plus polaires et donc plus hydrosolubles que les produits parents et généralement ils ont une activité biologique très diminuée. Le co-facteur UDPGA n'est pas disponible en grandes quantités dans la cellule, il peut donc devenir le facteur limitant de la réaction.
- * La conjugaison avec un groupe sulfate est catalysée par des enzymes cytoplasmiques, les sulfo-transférases, qui utilisent le cofacteur activé PAPS, c'est-à-dire le 3'-phosphoadénosyl-5'-phospho-sulfate, pour transférer un groupe SO_3^- au xénobiotique ou à son métabolite. Le foie est l'organe ayant le niveau le plus haut d'activité des sulfo-transférases, parmi les autres tissus, le plus riche en sulfo-transférases est l'intestin (Cappiello, 1989 ; Pacifici, 1988 ; Romiti, 1992).

Les conjugués sont excrétés principalement par la voie urinaire ; ceux qui prennent la voie hépatique, peuvent être hydrolysés par la microflore intestinale et le produit libéré peut être re-absorbé et repasser dans la circulation centrale, donnant lieu au cycle appelé « cycle enterohépatique » (Roberts, 2002).

Le co-facteur PAPS n'est pas disponible en grandes quantités dans la cellule, il peut donc devenir le facteur limitant de la réaction.

- * L'acétylation a lieu par transfert d'un groupement acétyl du cofacteur activé acétyl-CoA (acétyl Coenzyme A) au substrat déjà métabolisé en phase I ou au composé parent. Les enzymes qui effectuent ce transfert sont les acétyltransférases, situées dans le cytoplasme de la cellule. L'acétylation se produit principalement sur les atomes d'azote du substrat (amine) (Pacifici, 1988 ; Krishna, 1994).
- * La méthylation est la réaction de transfert d'un groupe méthyle du co-facteur S-adenosyl méthionine au xénobiotique ou au produit modifié par le métabolisme de phase I. Les enzymes cytoplasmiques méthyltransférases transfèrent un groupe méthyle du donneur, la S-adenosyl méthionine, sur un atome d'oxygène, d'azote (Lyon, 1981) ou de soufre (Weisiger, 1981) du substrat. Une méthyltransférase particulièrement importante pour l'inactivation extra-neuronale des catécholamines endogènes et des médicaments à structure analogue, est la COMT, la catécholamine-O-méthyl-transférase (Borchardt, 1981).
- * Les atomes des métaux tel le mercure (Hg), ou de métalloïdes tels l'arsenic (As) et le sélénium (Se) peuvent également être méthylés. Cette réaction, au contraire des réactions décrites précédemment, augmente la lipophilie du substrat, ce qui diminue sa solubilité dans l'eau et donc peut en augmenter la toxicité.
- * La conjugaison avec le glutathion est un des mécanismes principaux de défense de l'organisme contre des composés toxiques. La conjugaison avec le glutathion peut avoir lieu sur les atomes de carbone, oxygène, azote ou soufre du xénobiotique, par action des enzymes glutathion-S-transférases (GST). Les GST sont divisées en trois groupes : des enzymes cytoplasmiques, mitochondriaux et microsomaux. On connaît trois isoformes de la GST cytoplasmique soluble : la GST- π , la GST- α et la GST- μ (de Waziers, 1990 ; Krishna, 1994). La GST mitochondriale est aussi un enzyme soluble ; la GST membranaire microsomale, est bien moins connue (Hayes, 2005). Les produits conjugués sont excrétés à travers les voies biliaires principalement, et urinaires.

En général, l'excrétion à travers les voies biliaires est préférée pour les composés (endogènes, exogènes et leur métabolites) avec un poids moléculaire supérieur de 500-600, les molécules

avec un poids moléculaire plus bas sont éliminées principalement dans les urines (Roberts, 2002).

L'excrétion active des produits de conjugaison du glutathion des cellules hépatiques est, par certains auteurs, appelée phase III du métabolisme (Ishikawa, 1992).

- * La conjugaison avec des acides aminés est un autre mécanisme important qui provoque une augmentation de l'hydro-solubilité des xénobiotiques et favorise leur excrétion. La glycine est l'acide aminé le plus souvent utilisé pour la conjugaison, mais, selon les espèces et l'évolution, d'autres acides aminés peuvent être impliqués dans cette réaction. Les produits de la conjugaison avec des acides aminés sont éliminés par la voie urinaire. Leur excrétion dans l'urine est favorisée par la bonne solubilité dans la phase aqueuse des produits conjugués, qui peuvent passer dans le filtrat glomérulaire, par diffusion passive, si leur poids moléculaire est inférieur à 5 kD (Bonate, 1998).

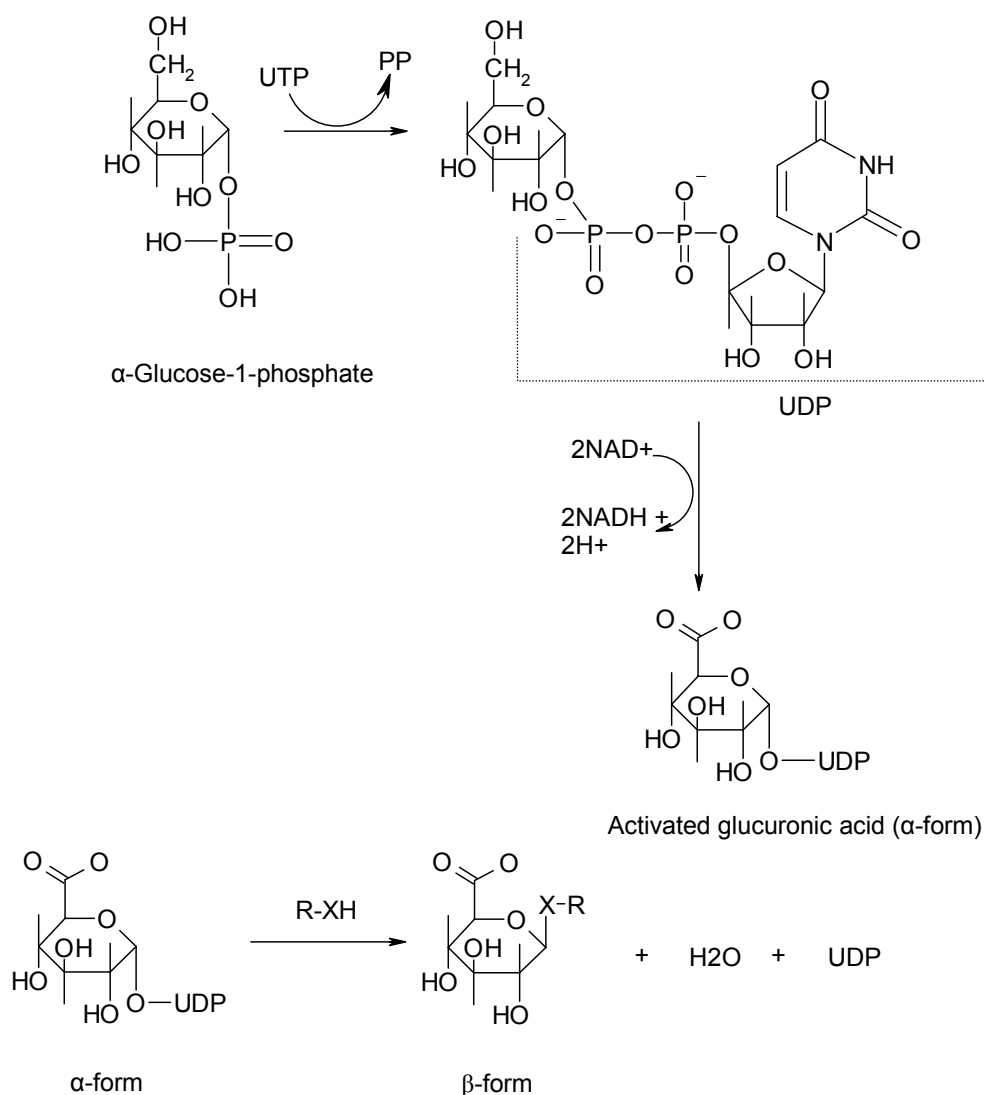
1.1.c Les enzymes responsables des réactions de Phase I

Certaines des nombreuses réactions de phase I, en particulier les oxydations, les réductions, et les dealkylations, sont réalisées par les cytochromes P450. Ces hémoprotéines sont localisés dans le réticulum endoplasmique (ER) de la cellule, et ce sont des enzymes trans-membranaires. La fraction cellulaire, obtenue par ultra-centrifugation (> 100'000 g), et contenant les membranes du réticulum endoplasmique riches en enzymes métaboliques, est communément appelée « microsomes » (Claude, 1946b). Claude (1946a) a été le premier à isoler la fraction microsomale, et à la définir comme la fraction constituée de petits éléments avec un diamètre compris entre 50 et 300 μ . Les microsomes sont un système très utilisé pour les études de métabolisme *in vitro*, car ils contiennent les enzymes métaboliques du ER, en particulier les cytochromes P450, les flavine monooxygénases (FMO) et les UDP-glucuronosyl transférases (UGT) (Williams A.J., 2003). Les microsomes le plus souvent employés sont ceux de foie, l'organe le plus riche d'enzymes métaboliques ; mais les microsomes d'autres tissus sont aussi utilisés pour des études de métabolisme, comme les microsomes de poumon (Woodcroft, 1997) ou d'intestin (Peng, 2004 ; Koudriakova, 1998).

Les nombreuses isoformes de cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques sont responsables de la métabolisation d'une grande variété de molécules. En plus, certaines isoformes, dont le plus abondant est le CYP3A4, sont capables de métaboliser molécules avec structures chimiques très diverses.

A côté de la grande importance des cytochromes P450 dans le métabolisme de phase I, il existe plusieurs enzymes non-hémoprotéines, qui jouent un rôle dans la biotransformation des xénobiotiques.

Parmi ces enzymes, les plus importantes pour le métabolisme des xénobiotiques chez l'homme, sont les flavine monooxygénases (FMO), les xanthine oxydases (XO) et xanthine dehydrogénases (XD), les aldéhyde oxydases (AO), les époxyde hydrolases (EH) et autres enzymes hydrolytiques.



(a)

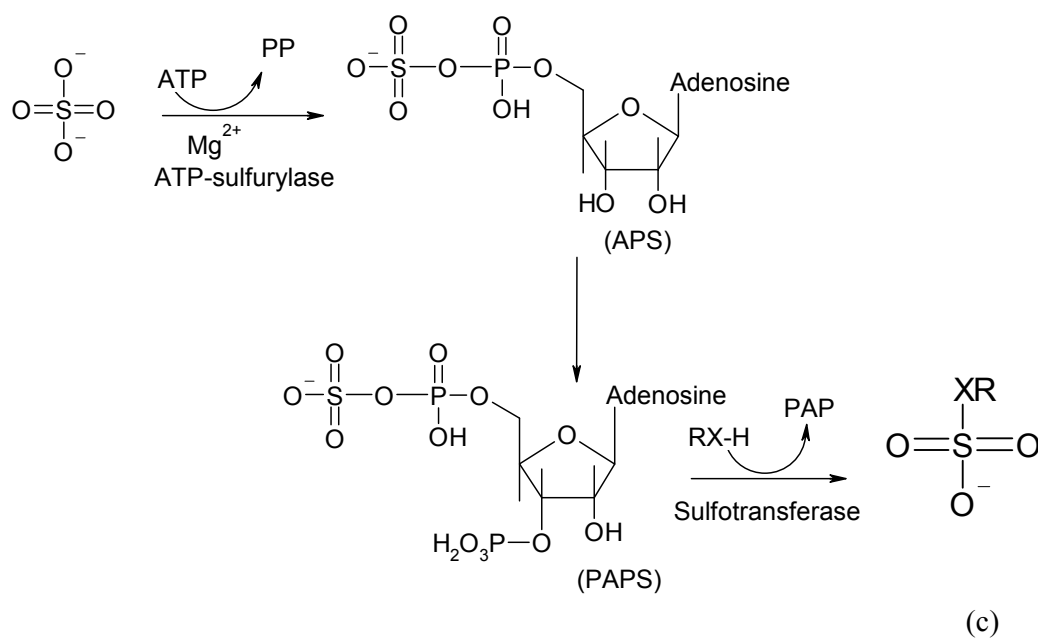
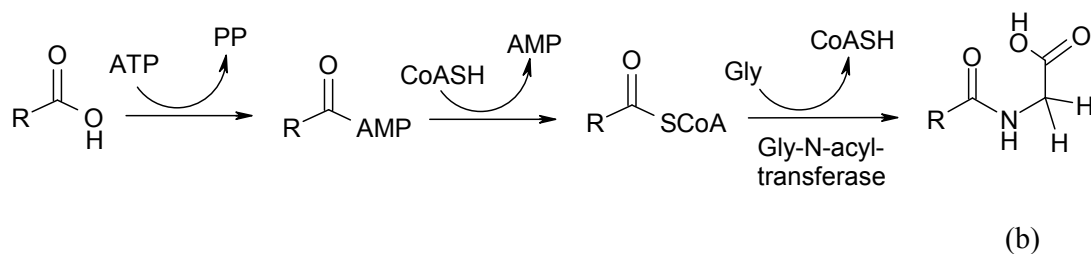


Figure 1.3 : Trois exemples de réactions métaboliques de phase II. (a) Activation du glucose en acide glucuronique activé et liaison au substrat. Le glucose et ses formes activées ont leur carbone anomérique C1 en configuration α , qui possède un niveau énergétique élevé. Le produit final a son carbone anomérique en configuration β , plus stable. (b) Conjugaison d'un acide avec un acide aminé (glycine). Dans ce cas, l'acide est activé par formation d'un acyl-CoA réactif. (c) Conjugaison avec un groupe sulfate fourni par le PAPS, dont la fonction sulfate est activée par liaison avec une molécule d'AMP.

Les flavine monooxygénases (FMO) de mammifère sont une famille d'enzymes constituée de cinq isoformes, dépendants du NADPH et de l'oxygène (Lawton, 1994) et localisé dans le

réticulum endoplasmique. Elles contiennent un système qui fonctionne comme oxydase sur les atomes de soufre, azote et phosphore (nucléophiles) (Poulsen, 1979). Chaque molécule de protéine contient au site actif une molécule de FAD, lié par liaison non-covalente. Pour l'initiation du mécanisme catalytique il est nécessaire d'établir une liaison du NADPH et de l'O₂ sur l'enzyme pour générer l'espèce FAD C-4 α -hydroperoxyde ; l'oxygène distal de cet hydroperoxyde est attaqué par les atomes nucléophiles du substrat et le résultat est le transfert d'oxygène au substrat et la formation d'hydroxyflavin (Rettie, 1999) (Figure 1.4).

L'importance de cet enzyme pour le métabolisme chez l'homme est principalement lié à la détoxification et élimination de molécules thérapeutiques, comme les amines tertiaires (médicaments actifs au niveau du SNC, par exemple) (Cashman, 1992) ou les sulfoxydes (cimetidine et sulindac sulfide, dont la métabolisation est continuée par autres enzymes microsomaux) (Cashman, 1993).

Xanthine oxydase et xanthine dehydrogenase (XO/XD) sont les deux formes d'un enzyme soluble homo-dimère. Chacune des sous-unités contient un atome de molybdène sous forme de cofacteur de la molybdopterin [Mo^{VI}(=S)(=O)]²⁺, une molécule de FAD et deux centres Fe₂ – S₂ (Testa, 1995). La réaction générale catalysée par la XO/XD est l'oxydation de la xanthine en acide urique ; la molybdopterin fournit le premier accepteur d'électrons et l'atome d'oxygène, qui est transféré au substrat, et ensuite remplacé par un oxygène provenant de l'eau (Hille, 1987). Le flux d'électrons continue dans l'enzyme vers les groupements Fe₂ – S₂, le FAD et, ensuite, vers les accepteurs finaux d'électrons : NAD⁺ pour l'activité de dehydrogenase (XD) ou l'O₂ pour l'activité d'oxydase (XO).

En premier lieu, la XO/XD est responsable de la biotransformation des purines endogènes, mais elle est aussi capable de métaboliser des composés exogènes avec une structure analogue. Les tissus humains les plus riches en XO/XD sont le foie et la paroi intestinale, où cet enzyme est impliqué dans le métabolisme de nombreux xénobiotiques. Par exemple, la XO/XD métabolise la 1-méthylxanthine (un dérivé de la caféine) en acide 1-méthyl urique (Miners, 1996) et l'allopurinol en alloxanthine, un inhibiteur de la XO même ; cet enzyme est responsable de la bioactivation de la mitomycine C (Pritsos, 1994), une molécule anticancéreuse, mais il est aussi impliquée dans le métabolisme de premier passage de la 6-mercaptopurine, un autre médicament anticancéreux (van Meerten, 1995).

L'aldéhyde oxydase (AO) est un enzyme cytoplasmique qui a beaucoup de similarités avec la XO/XD : elle est un molybdo-enzyme dont le cycle catalytique ressemble au cycle de la XO/XD (Turner, 1995).

Les époxyde hydrolases (EH) sont des enzymes distribués dans différents tissus dans l'organisme humain (la plus haute concentration de cet enzyme se trouve dans le foie), et au niveau sub-cellulaire ils sont présents soit dans le ER soit dans le cytoplasme. Elles ont pour fonction d'hydrolyser les époxydes, qui sont souvent des produits du métabolisme oxydatif des cytochromes P450 (Krishna, 1994).

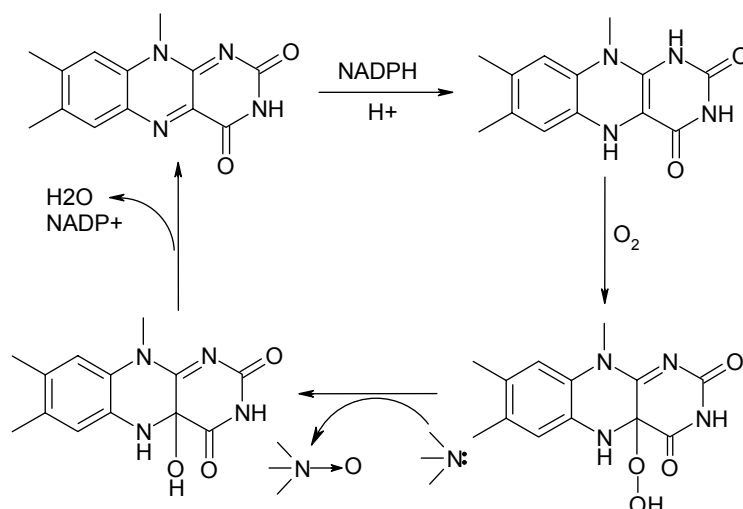


Figure 1.4 : Le cycle catalytique de la flavine de la FMO, enzyme catalytique de phase I, impliqué dans l'oxydation des substrats nucléophiles comme les amines tertiaires (Rettie, 1999).

1.2 Rôles des Cytochromes P450

Les cytochromes P450 sont présents dans organismes procaryotes (bactéries) et eucaryotes (champignons, végétaux, animaux). Ils sont impliqués dans nombreuses réactions métaboliques concernant soit la synthèse et dégradation des composés endogènes, soit la biotransformation de composés exogènes.

Chez les mammifères, les nombreuses isoformes de cytochromes P450 sont distribuées dans plusieurs tissus. Grâce aux diverses spécificités des différentes isoformes et à la basse spécificité de certaines isoformes, les différents cytochromes P450 sont impliqués dans de nombreux processus métaboliques. Par exemple, des molécules endogènes comme les hormones stéroïdiennes, les acides biliaires, les rétinoïdes, les uroporphyrinogènes sont produits et dégradés par des isoformes de cytochromes P450. Pourtant, ces enzymes constituent le système

le plus efficace d'élimination des substances exogènes car ils ont la capacité de métaboliser une grande variété de composés très différents : des médicaments, des substances polluantes, des composés d'origine naturelle.

Le métabolisme des xénobiotiques par les cytochromes P450 a comme but de faciliter l'élimination de ces molécules étrangères à l'organisme. Mais dans certains cas, les biotransformations effectuées par les cytochromes P450, peuvent avoir des conséquences négatives : générer des métabolites réactifs à partir de composés inoffensifs ou échouer à détoxifier des composés toxiques. Une conséquence toxique possible de la métabolisation par les cytochromes P450 est la liaison de métabolites réactifs directement au cytochrome P450 (inhibition suicide), ou leur sortie du site actif de l'enzyme pour attaquer d'autres protéines cellulaires, les lipides membranaires ou l'ADN. De toute façon, les voies de toxicité sont nombreuses et elles dépendent de la structure de chaque molécule et ses métabolites.

1.2.a Biosynthèse de composés endogènes

On considère que tous les cytochromes P450, impliqués dans le métabolisme des composés exogènes, ont aussi un ou plusieurs substrats endogènes. Chez l'homme, il y a plusieurs exemples de cette double fonction.

- L'acide arachidonique est métabolisé par 14 isoformes de cytochromes P450 en 102 dérivés différents. Dans le catabolisme de l'acide arachidonique, les cytochromes P450 effectuent des oxydations, réductions et époxydations, pour arriver aux produits de dégradation, dont certains ont des fonctions de régulation de différents processus physiologiques. Les prostaglandines dérivées de l'acide arachidonique ont des fonctions liées à la vasoconstriction, à la broncho-dilatation et à la broncho-constriction, à la formation d'œdème, à des réactions allergiques, à l'inhibition de la formation des agrégats thrombotiques, et autres (Nebert, 2002). L'oxydation des prostaglandines – et en particulier de l'endoperoxyde des prostaglandines – peut être réalisé par les cytochromes P450, dont l'isoforme la plus active est le CYP3A4 (Plastaras, 2000). Si on tient compte de la variété des réponses physiologiques provoquées par les dérivés de l'acide arachidonique, on peut comprendre l'importance d'une expression correcte et équilibrée des différentes isoformes des cytochromes P450 pour maintenir l'équilibre des effets des prostaglandines dans l'organisme.

- Plusieurs isoformes de cytochromes P450 sont impliquées dans le processus de synthèse du cholestérol à partir de l'acétate, et de son élimination, sous forme d'acide biliaires. Pour la synthèse du cholestérol, l'action du CYP51A1, qui catalyse la deméthylation du lanosterol, est

cruciale. Les hormones stéroïdiennes sont hydroxylés par des cytochromes P450, avec diverses spécificités qui dépendent de l'isoforme (Waxman, 1991). Mais les cytochromes P450 ont aussi un rôle important dans la dégradation des stéroïdes : ils catalysent les hydroxylations et le raccourcissement de la chaîne latérale pour obtenir des acides biliaires hydrosolubles (figure 1.5). Les acides biliaires sont donc hydroxylés par des cytochromes P450 et en particulier par le CYP3A4, qui catalyse l'hydroxylation des acides taurochénodéoxycholique et lithocholique (Araya, 1999).

- Un autre exemple de l'implication des différentes isoformes de cytochromes P450 dans le métabolisme de molécules endogènes est la synthèse et dégradation de la 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ (Nebert, 2002) : quatre isoformes (soit mitochondriaux, soit de réticulum endoplasmique) participent à ce processus métabolique.
- L'hydroxylation de l'acide rétinolique (vitamine A) et sa destruction sont aussi effectuées par trois isoformes de cytochromes P450.

1.2.b Catalyse des réactions sur les composés exogènes (xénobiotiques)

Les nombreuses réactions catalysées par les cytochromes P450, spécialement sur les composés exogènes, dont ils provoquent la détoxification ou la bioactivation, peuvent être classifiées en deux groupes : les réactions d'oxydation et autres réactions moins communes (Guengerich, 2001). Les schémas des réactions plus communes catalysées par les cytochromes P450 sont résumés en figure 1.6 (Guengerich, 1984 ; Guengerich, 2001).

La réaction, la plus commune catalysée par les cytochromes P450, est l'hydroxylation d'un atome de carbone d'un composé aliphatique. La réaction d'hydroxylation donne comme produit un alcool, par abstraction d'un atome d'hydrogène et liaison de l'atome d'oxygène. La formation d'un intermédiaire radicalaire dans le mécanisme de la réaction d'hydroxylation a été démontrée depuis longtemps (Groves, 1978), mais la structure exacte de cet intermédiaire est encore inconnue. La réaction présentée en figure 1.6(a) suit le mécanisme connu comme « oxygen-rebound mechanism », qui est une des interprétations possibles de la réaction d'oxydation.

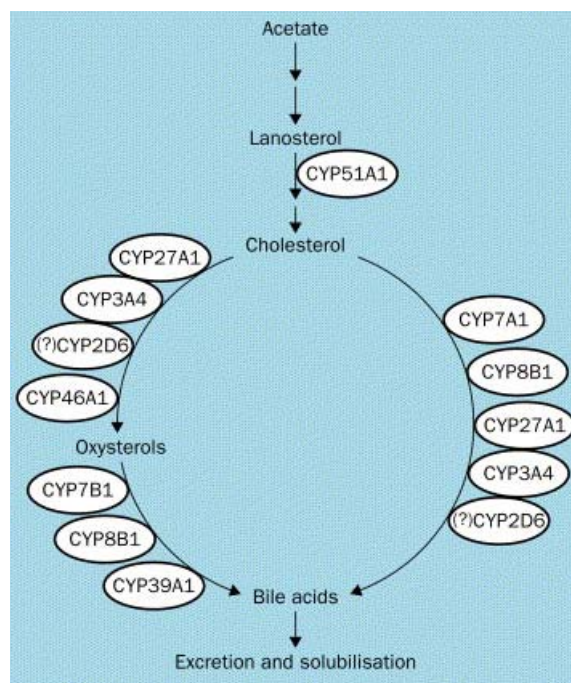


Figure 1.5 : Cytochromes P450 jouant un rôle dans la synthèse du cholestérol et des acides biliaries. Entre l'acétate et le cholestérol on lie six transformations et autres six du cholestérol aux acides biliaries. Parmi ces acides on trouve l'acide cholique, chénodéoxycholique, et plusieurs autres dérivés (Nebert, 2002).

Les alcools primaires peuvent être ultérieurement oxydés en aldéhydes par action des cytochromes P450. L'oxydation ultérieure en acides carboxyliques n'est pas généralement une réaction catalysée par les cytochromes P450, mais plutôt par les aldéhyde oxydases ; une exception est l'éthanol, qui est un substrat du CYP2E1. L'éthanol est oxydé par cette isoforme d'abord en acétaldéhyde et successivement en acide acétique (Bell-Parikh, 1999).

Les liaisons C-H ne sont pas les seules susceptibles d'oxydation par les cytochromes P450, mais aussi les hétéroatomes, et en particulier l'azote, le soufre, le phosphore et l'iode sont oxydés par les cytochromes P450. La réaction peut être expliquée par un mécanisme de transfert d'un électron, liaison d'un atome d'oxygène, et transfert successif d'un deuxième électron. Les hétéroatomes liés à plusieurs groupes alkyles, peuvent aussi être déalkylés par les cytochromes P450. Cette réaction provient de l'hydroxylation formelle de la liaison C-H adjacente à l'hétéroatome ; le composé résultant est un héli-aminal instable qui subit la rupture de la liaison entre le carbone et l'hétéroatome.

Les doubles liaisons ($C=C$), et celles des cycles aromatiques, sont attaquées par les cytochromes P450 qui produisent un époxyde, un métabolite électrophile extrêmement réactif et qui a une grande importance en toxicologie. L'époxyde réagit facilement avec les atomes nucléophiles des macromolécules biologiques, surtout avec les azotes des chaînes latérales et les sulfhydryles des protéines.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la réaction d'époxydation : processus concerté (Collman, 1985) ; réaction avec un intermédiaire radical ou radical cation (Traylor, 1987) ; réaction avec un intermédiaire fer-carbone (Groves, 1986).

L'hydroxylation est la réaction la plus commune des cytochromes P450, mais plusieurs réactions moins communes sont aussi catalysées par ces enzymes et résumées en figure 1.7.

Les cytochromes P450 sont capables de réduire différentes molécules exogènes. Parmi les composés qui sont réduits par les cytochromes P450, il y a les halogénures d'alkyle, comme l'halothane (van Dyke, 1976) et le tétrachlorure de carbone (Mico, 1983). Les produits de la réduction sont des haloalkanes réduits ou des oléfines. Les oxydes d'amine sont réduits par les cytochromes P450, mais aussi par d'autres enzymes. Les cytochromes P450 réduisent aussi les composés contenant des liaisons azote – azote (Testa, 1995), comme par exemple les composés diazoïques ou les diazènes ; la réduction à un électron des composés avec une structure similaire aux quinones, ou les dérivés nitro-aromatiques, produit des radicaux (Harrelson, 1982), qui peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire pour donner le radical anion superoxyde, capable d'attaquer les macromolécules biologiques, et donc très dangereux pour les structures cellulaires.

Un passage important du métabolisme des acides gras est la déhydrogénation (ou désaturation). Elle peut être catalysée, parmi d'autres enzymes, par les cytochromes P450. Un mécanisme proposé pour expliquer ce type de réaction a été démontré pour la déhydrogénation de l'acide valproïque. La première étape de ce mécanisme est l'hydroxylation d'un atome de carbone d'une des deux chaînes aliphatiques de l'acide valproïque par abstraction d'un atome d'hydrogène (Rettie, 1987).

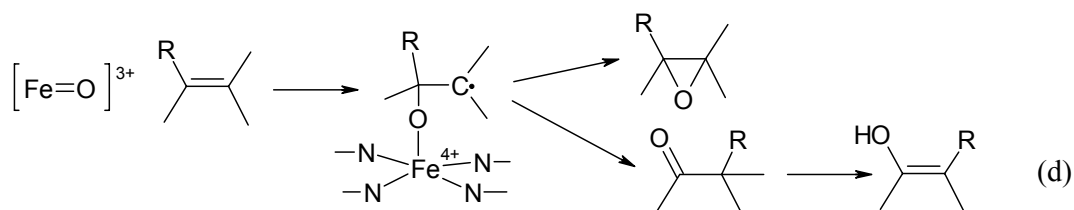
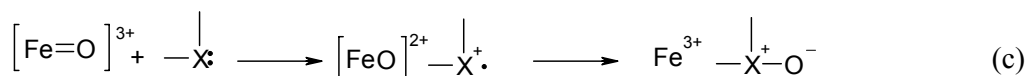
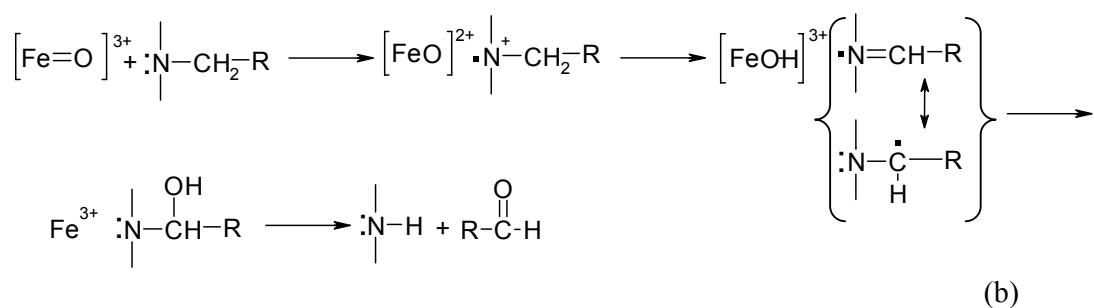
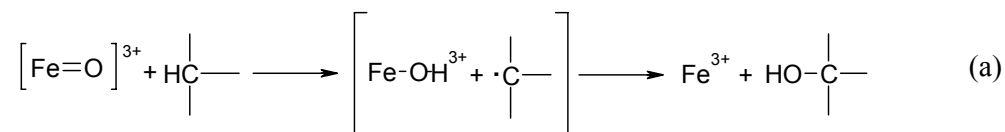


Figure 1.6 : Quatre exemples de réactions oxydatives catalysées par les cytochromes P450. (a) Hydroxylation d'un atome de carbone, via un intermédiaire radicalaire (mécanisme "oxygen-rebound") ; (b) libération d'un hétéroatome (un azote dans l'exemple) par oxydation du carbone adjacent ; (c) oxygénation d'un hétéroatome ; (d) époxydation et migration d'un groupe R, par un mécanisme radicalaire (Guengerich, 1984 ; Guengerich, 2001).

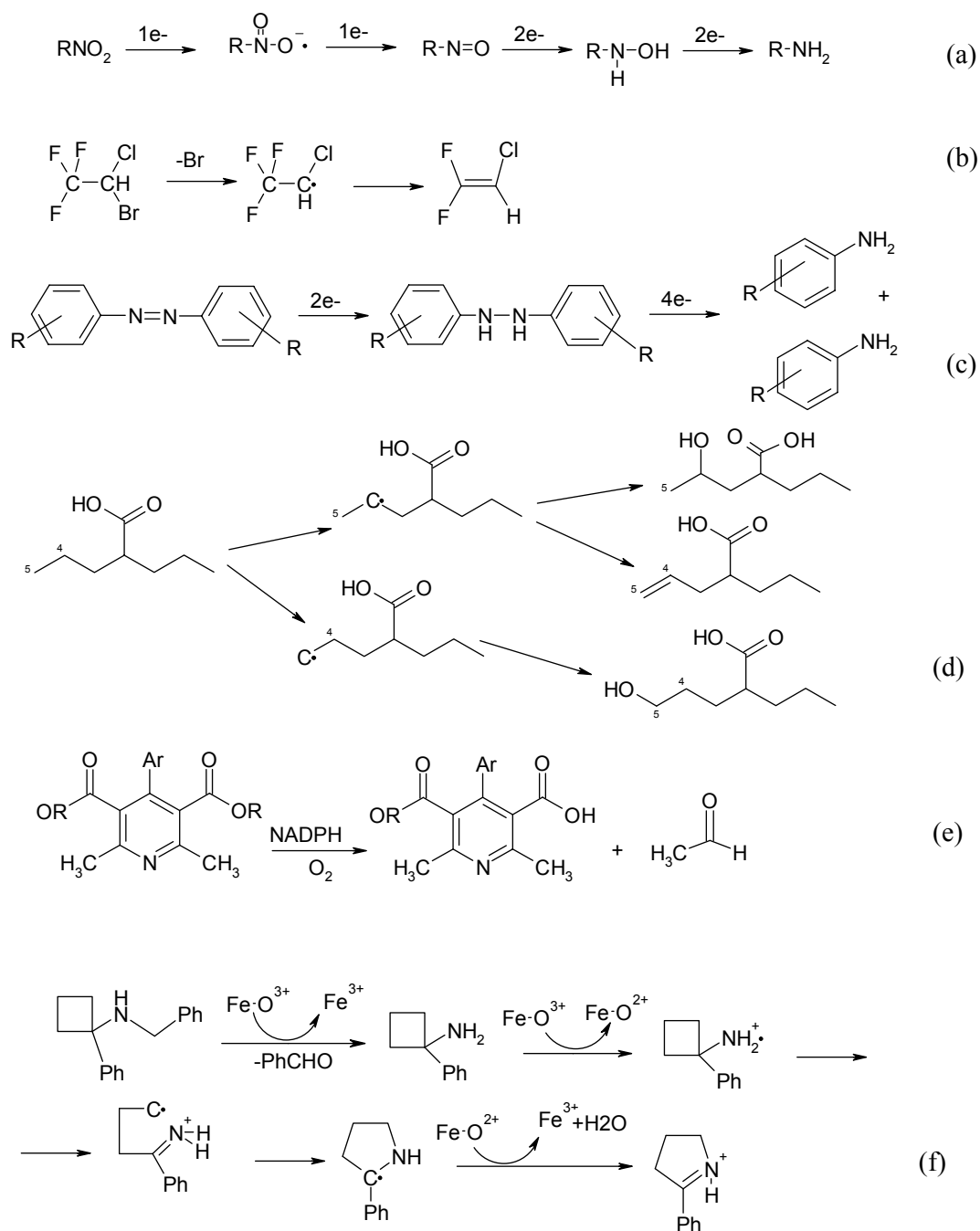


Figure 1.7 : Exemples de réactions diverses catalysées par les cytochromes P450. (a) Réduction des groupes nitro ; (b) dehalogénéation réductive de l'halothane ; (c) réduction d'un composé azo ; (d) différents métabolites possibles de l'acide valproïque, parmi lesquelles aussi un produit insaturé réduit (Rettie, 1987) ; (e) rupture oxydative de la liaison ester de dérivés de la pyrimidine ; (f) expansion du cycle de la cyclobutylamine, catalysée par les cytochromes P450 (Guengerich, 2001).

Les cytochromes P450 sont capables de catalyser la rupture de la liaison ester, avec un mécanisme oxydatif, différent de l'hydrolyse. En fait, les produits de la réaction sont un acide carboxylique et une aldéhyde (Guengerich, 1987) et non un alcool, comme il serait attendu après une rupture hydrolytique.

L'expansion d'un cycle organique est une réaction rare. Elle a été expliquée avec l'hypothèse de la formation des intermédiaires instables qui se réarrangent dans un cycle à cinq ou six atomes, qui est plus stable. Des études ont été accomplies sur la cyclobutylamine (Bondon, 1989), dont la structure à quatre atomes est convertie dans une pyrroline, à cinq atomes, beaucoup plus stable.

Une autre réaction possible est la formation des nouveaux cycles comme conséquence de l'oxydation par les cytochromes P450. L'oxydation provoque la cyclisation de produits particuliers, par exemple les dihydro-pyridines (Guengerich, 1988) ou la pulégone, qui est activé en menthofurane (composé cyclique) et ensuite en γ -lactone (Thomassen, 1992).

D'autres réactions moins communes des cytochromes P450 sont les scissions des aldéhydes, la déhydratation, les réactions d'attaque sur les cycles aromatiques, l'oxydation à un électron, le réarrangement de prostaglandines et acides gras (Guengerich, 2001).

La grande variété des substrats métabolisés par les cytochromes P450 et les nombreuses réactions catalysées montrent l'importance de ces enzymes dans les processus métaboliques et dans la détoxification des xénobiotiques.

1.3 Fonctionnement des Cytochromes P450

1.3.a Considérations structurales et cycle catalytique

Les cytochromes P450 sont des monooxygénases capables d'activer une molécule de dioxygène pour en incorporer un atome dans des liaisons C-H, et l'autre atome dans une molécule d'eau. L'activité catalytique est influencée par la structure soit du centre métallique, soit de la protéine tout autour du métal.

Les cytochromes P450 sont des protéines transmembranaires, ubiquitaires, ayant tous une structure très similaire au niveau du site actif et le même cycle catalytique.

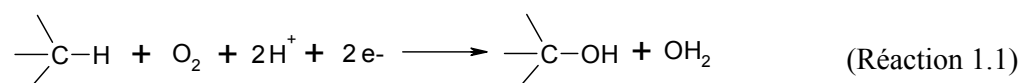
Le plus étudié des cytochromes P450 est le cytochrome P450_{cam} de *Pseudomonas putida*, qui catalyse l'hydroxylation du camphre. C'est un enzyme soluble ; c'est le premier cytochrome P450 cristallisé et dont la structure aux rayons X a été déterminée (Poulos, 1985 ; Poulos, 1987). Parmi les enzymes de mammifères, le premier cytochrome P450 purifié a été le P450 LM2, de foie de lapin (Coon, 1979). Mais la première structure aux rayons X d'un cytochrome P450 de mammifère, modifié génétiquement pour le rendre soluble, est celle du CYP2C5 de lapin, une

progestérone hydroxylase (Williams, 2000). Plus récemment, ont été déterminées les structures aux rayons X de deux cytochromes P450 humains : le CYP2C9 (Williams P.A., 2003) et le CYP3A4 (Yano, 2004 ; Williams, 2004). Pour permettre la solubilisation et la cristallisation de ces enzymes trans-membranaires, la séquence N-terminale (environ 25 acides aminés) de la protéine a été coupée ; en plus, dans le cas du CYP2C9, sept acides aminés de la région F-G de la protéine ont été substitués par mutagenèse, pour améliorer la cristallisation de l'enzyme. Les tests effectués par les auteurs (Williams P.A., 2003) montrent que les modifications de la chaîne protéique n'ont pas produit des changements évidents de l'activité catalytique du CYP2C9.

Les deux isoformes de cytochromes P450 ont été cristallisés soit en présence d'un ligand au site actif (warfarine pour le CYP2C9, metyrapone et progestérone pour le CYP3A4), soit en absence de ligand. Une structure aux rayons X successive du CYP2C9 complexé avec le flurbiprofène, a été obtenue après la modification seulement de la partie N-terminale de la protéine, et montre le substrat lié dans une position qu'en permet l'oxydation (Wester, 2004).

Malgré les différences structurales, tous les cytochromes P450 présentent, dans le site actif, un atome de fer Fe(III) à bas spin, hexacoordonné en équilibre avec la forme Fe(III) à haut spin, pentacoordonné, qui est coordonné par les quatre atomes d'azote d'une porphyrine (protoporphyrine IX), le cinquième ligand est le soufre (Murakami, 1967) d'une cystéine et, en absence d'un substrat, le sixième ligand est un oxygène (Sakurai, 1985). L'atome d'oxygène appartient à une thréonine du site actif dans le cas du cytochrome P450_{cam}, dans autres isoformes, y compris les CYP3A4 et CYP2C9 (figure 1.8) l'oxygène appartient à une molécule d'eau.

La réaction générale d'hydroxylation catalysée par tous les cytochromes P450 est la suivante :



C'est-à-dire, l'incorporation d'un atome d'oxygène dans un substrat organique, réduction de l'autre atome d'oxygène et élimination d'une molécule d'eau.

Le cycle catalytique a été décrit soit pour les cytochromes P450 des mammifères soit pour ceux des bactéries, après l'isolement et la caractérisation de quatre intermédiaires (figure 1.9, a-d) cruciaux. La littérature concernant les études sur le cycle catalytique des cytochromes P450 est très ample et les interprétations des données, où il n'y a pas des démonstrations univoques, sont très variables. Cependant, il y a des descriptions généralement acceptées, comme celle rapportée ci-dessous (Mansuy, 1995).

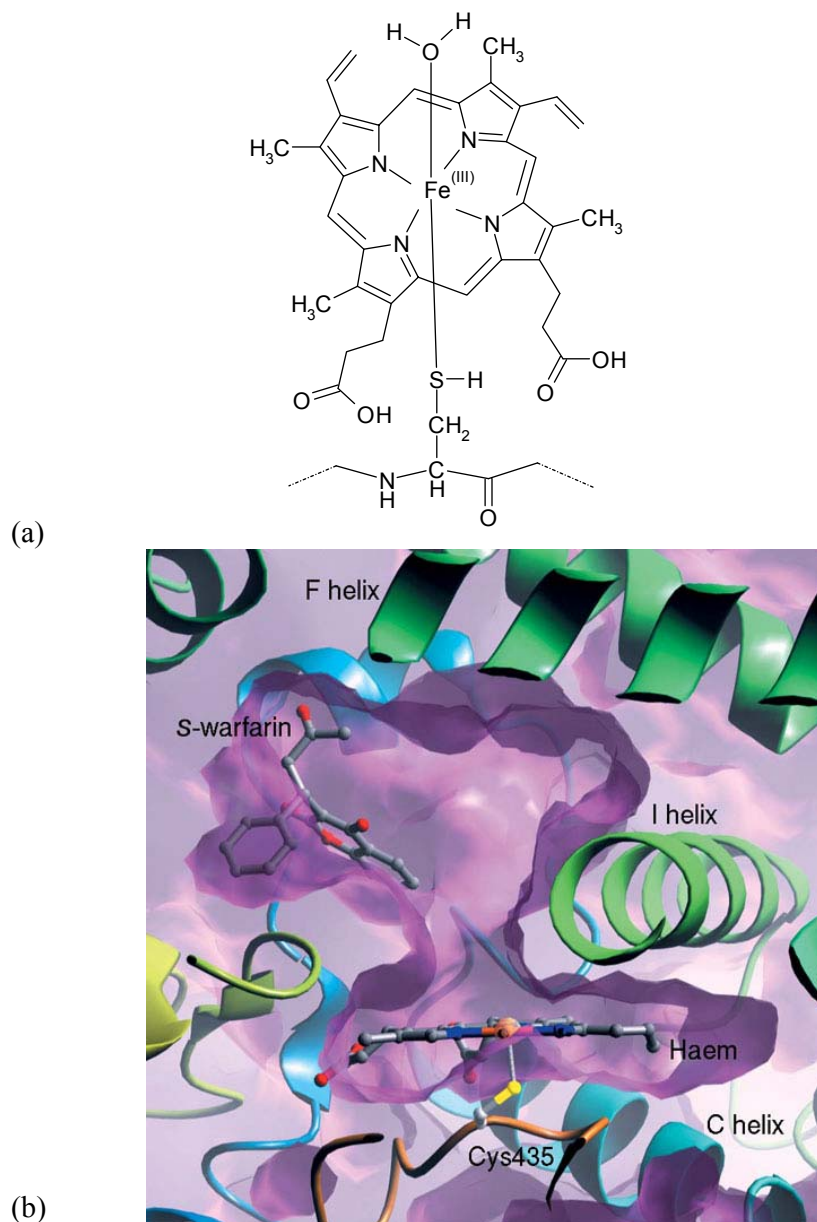


Figure 1.8 : (a) Structure chimique du groupe prosthétique (hème) des cytochromes P450. La porphyrine (protoporphyrine IX) entoure l'atome de fer, qui est bloqué dans le cycle par quatre liaisons de coordination avec les atomes d'azote. Un atome de soufre d'une cystéine est le cinquième ligand et une molécule d'eau est le sixième, quand aucun substrat n'est lié. (b) Le cycle de l'hème dans le site actif du CYP2C9 ; dans cette représentation, on peut remarquer la structure planaire de la porphyrine et le cinquième ligand, l'atome de soufre d'une cystéine. Cette représentation de la structure aux rayons X (Williams, 2003) présente aussi un ligand (S-warfarine) dans le site actif de l'enzyme, mais il se trouve dans une position trop éloignée du centre métallique pour qu'il soit métabolisé.

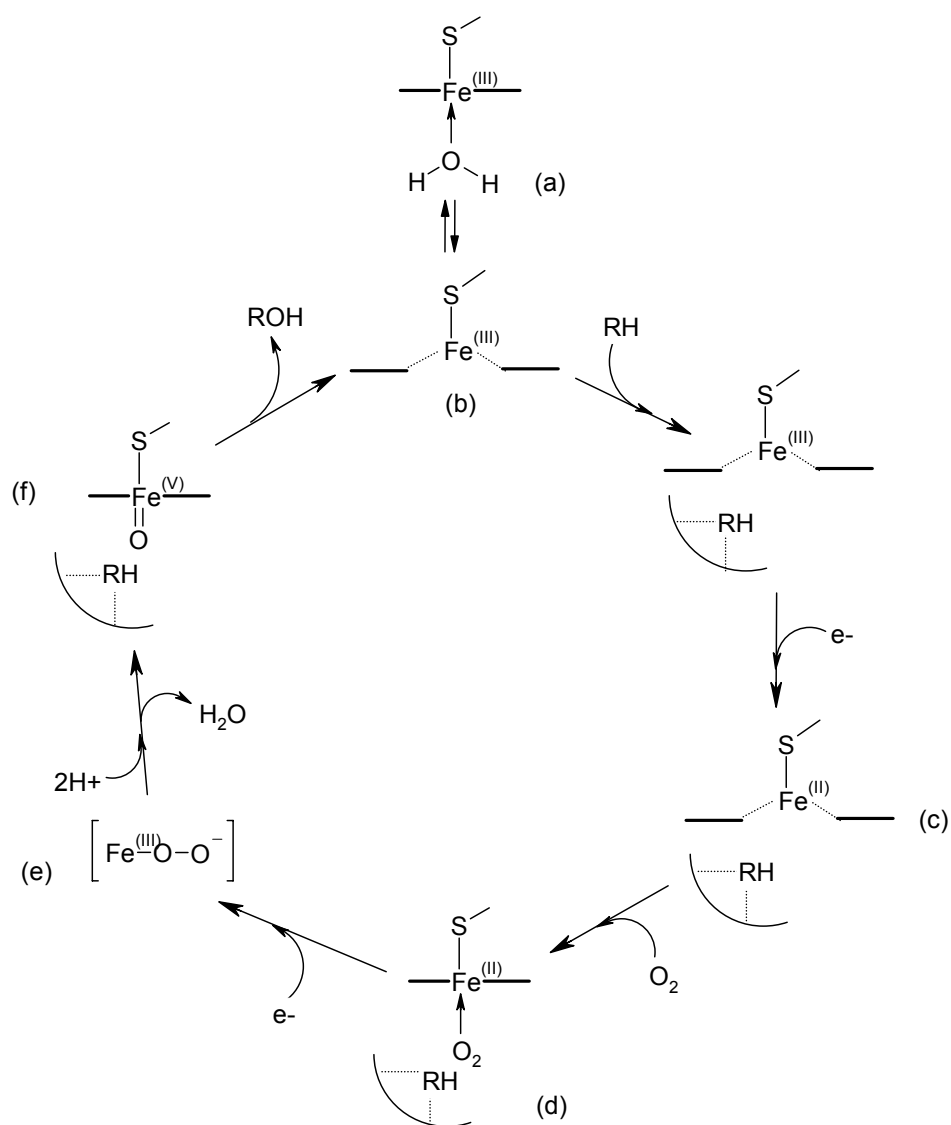


Figure 1.9 : Le cycle catalytique des cytochromes P450. Le cycle est ici présenté à travers des états d'oxydation de l'atome du fer dans le groupe prosthétique. Les intermédiaires de réaction de (a-d) ont été isolés et caractérisés, et ils ont permis de décrire le cycle catalytique. Les intermédiaires suivants sont extrêmement instables et n'ont pas été isolés (Mansuy, 1995 ; Dawson, 1987).

Au repos, la forme (a) avec le centre métallique sous forme de Fe(III), hexacoordonné, bas spin, se trouve en équilibre avec la forme (b), avec l'atome de fer pentacoordonné, et à haut spin. La liaison d'un substrat dans le site actif du cytochrome P450, à proximité de l'hème, provoque un déplacement de l'équilibre vers cette deuxième forme, plus facile à réduire. Après acceptation

d'un électron, le complexe est réduit en Fe(II) (spin haut). Le complexe du Fe(II) à haut spin (c) est capable de lier l'oxygène moléculaire (O_2) et de se transformer dans un complexe hexacoordonné (d). Les complexes dérivés de la réduction mono-électronique de l'adduit à l'oxygène, sont très instables, et ils n'ont jamais été isolés jusqu'à présent. Pour le premier intermédiaire (e), une hypothèse de structure généralement acceptée, est d'un complexe Fe(III)-peroxyde $[Fe(III)-O-O^-]$ ou $[Fe(III)-O-O-H]$. La rupture hétérolytique de la liaison O-O conduit au complexe fer-oxo à haute valence $[Fe(V)=O]$ (f) qui réagit avec le substrat. Une autre représentation possible de ce complexe à haute valence est : $Fe(IV)=O$, avec un radical-cation sur le cycle de la porphyrine (Mansuy, 1995 ; Dawson, 1987).

1.3.b Chaîne de transfert des électrons

Pour fonctionner, les cytochromes P450 ont besoin d'oxygène, de protons et d'électrons, comme résumé dans la réaction générale (Réaction 1.1). Les électrons proviennent d'un donneur d'électrons, le NADPH ou NADH, et arrivent au cytochrome P450 par un système de transfert d'électrons.

La chaîne de transfert des électrons du cytochrome P450_{cam} (qui est un cytochrome bactérien soluble) est connue depuis longtemps (Katagiri, 1968) : les électrons provenant du NADH passent sur une réductase (une flavoprotéine), puis sur une rédoxine (putidarédoxine, une protéine fer-soufre) et ensuite sur le cytochrome P450 qui les utilise pour la réduction de l'oxygène.

Le système de transfert des électrons des cytochromes P450 microsomaux et eucaryotes est plus complexe et comprend quatre protéines membranaires, distribuées au hasard dans la membrane microsomale et qui interagissent par collisions dues à la diffusion latérale dans le double feuillet lipidique. Les enzymes de transfert des électrons ne sont pas simplement le cytochrome P450 et la NADPH-cytochrome P450-réductase, comme rapporté dans les premières études dans ce domaine (Lu, 1976), mais dans le processus de transfert des électrons sont aussi impliqués le cytochrome b_5 et la cytochrome b_5 -réductase. La cytochrome P450-réductase contient une molécule de FAD (flavine-adenine-dinucléotide) et une de FMN (flavine-mono-nucléotide) et, en conditions particulières, elle peut aussi remplacer la NADH-cytochrome b_5 -réductase (Vermilion, 1981). Les deux électrons nécessaires pour l'hydroxylation des substrats sont fournis par le NADPH ; ils passent par la cytochrome P450-réductase et la cytochrome b_5 -réductase pour arriver au cytochrome P450. Le premier des deux électrons est transféré au cytochrome P450

exclusivement via NADPH-cytochrome P450-réductase, le deuxième électron est préférablement transféré via cytochrome b₅ (Taniguchi, 1984).

1.4 Classification des Cytochromes P450

1.4.a Classification générale des Cytochromes P450

Le problème d'une nomenclature générale et unifiée pour tous les cytochromes P450 est né quand le nombre des isoformes différentes découvertes est devenu trop grand pour laisser chaque laboratoire nommer les nouveaux cytochromes indépendamment, et pour éviter de créer une confusion totale. En 1987, les chercheurs les plus importants engagés dans la recherche sur les cytochromes P450 signèrent la première publication qui donne les directives pour une nomenclature unifiée des cytochromes P450 (Nebert, 1987).

La nomenclature proposée était basée sur la division des cytochromes P450 en familles, définies par similarité des séquences protéiques, plutôt que par similarité des séquences des nucléotides des gènes codant pour les protéines. Deux cytochromes P450 avec une séquence des acides aminés avec plus du 70% d'identité appartiennent à la même sous-famille, si l'identité est comprise entre le 40 et le 70% ils font partie de la même famille, si ils ont en commun moins de 40% de la séquence, ils appartiennent à deux familles différentes.

Le nom de chaque cytochrome était composé de quatre parties : le préfixe « P450 », suivi par un numéro romain indiquant la famille, une lettre majuscule pour la sous-famille et une chiffre arabe indiquant le cytochrome P450 spécifique, par exemple P450IA2. Au moment de cette première revue le nombre total de cytochromes P450 connues était de 65.

Dans les années suivantes, les cytochromes P450 découverts sont devenus de plus en plus nombreux et on a publié des mises au jour de la liste complète, qui apportent aussi des petites modifications de la nomenclature. Le préfixe « P450 » a été remplacé par « CYP » pour les cytochromes eux-mêmes, « *CYP* » (en italique) pour les gènes codant pour les différents cytochromes P450 et « *Cyp* » pour les gènes des cytochromes P450 de souris (Nebert, 1991). On propose aussi l'utilisation des numéros arabes pour indiquer la famille des cytochromes P450, par exemple CYP1A2, *CYP1A2* ou *Cyp1a2* (pour la souris). La division en familles reste pourtant basée sur la similarité des séquences des acides aminés.

Dans la mise au jour datée 1996, on trouve un total de 481 gènes codant pour des cytochromes P450 (Nelson, 1996), dont une bonne partie appartenait à des espèces procaryotes. La division en familles et sous-familles basée sur les séquences protéiques, a été mise en relation avec une classification construite sur la différenciation génétique due à l'évolution des espèces.

Comme déjà pour la représentation de l'évolution de différentes espèces vivantes, on a construit des arbres phylogénétiques (phylogenetic trees), comme représentations de l'histoire évolutive de la famille des cytochromes P450. Ces diagrammes montrent des relations entre les gènes codants pour les cytochromes P450, dues au chemin évolutif des espèces. Un exemple d'arbre phylogénétique est présenté en figure 1.10 : il représente la différenciation de 43 familles de cytochromes P450 animaux, à partir d'un seul gène ancestral (Nelson, 1999).

Le nombre des gènes découverts augmente continuellement et à présent la classification est maintenue à jour sur deux sites Internet. Un site est réservé aux cytochromes P450 humains et leur polymorphisme (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>) (Ingelman-Sundberg, 2000 ; Oscarson, 2002) ; l'autre site accueille une base de données qui contient toutes les cytochromes P450 connus, appartenant aux espèces animales, végétales ou bactériennes (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Les statistiques les plus récentes rapportent au total 4504 gènes codant pour des cytochromes P450. Dans le génome humain on a trouvé 57 gènes actifs et 58 pseudo-gènes codant pour des cytochromes P450 (Ingelman-Sundberg, 2005).

1.4.b Les familles des Cytochromes P450 humains

Des 292 familles de cytochromes P450 connues, l'homme en possède seulement 18, divisées en 42 sous-familles composées au total par 57 gènes et 58 pseudogènes. Les fonctions des cytochromes P450 concernent soit le métabolisme de composés endogènes, soit la biotransformation (détoxification ou bioactivation) des xénobiotiques.

Les cytochromes humains impliqués dans le métabolisme des composés exogènes font partie quasi exclusivement des familles *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* et *CYP4* (Nebert, 2002).

* Famille *CYP1* (Guengerich, 1995)

Les cytochromes humains de la famille *CYP1* sont divisés dans les sous-familles CYP1A et CYP1B.

La sous-famille CYP1A contient deux membres, les CYP1A1 et CYP1A2, dont les séquences protéiques sont identiques à 70%.

Le CYP1A1 est exprimé en quantité très basse dans le foie, c'est essentiellement un enzyme extra hépatique. La présence de cette isoforme de cytochrome P450 a été démontrée et étudiée dans le poumon, les lymphocytes et le placenta. Le CYP1A1 est responsable de l'oxydation de nombreux hydrocarbures polycycliques aromatiques.

La synthèse du CYP1A1 peut être induite par la fumée de cigarette.

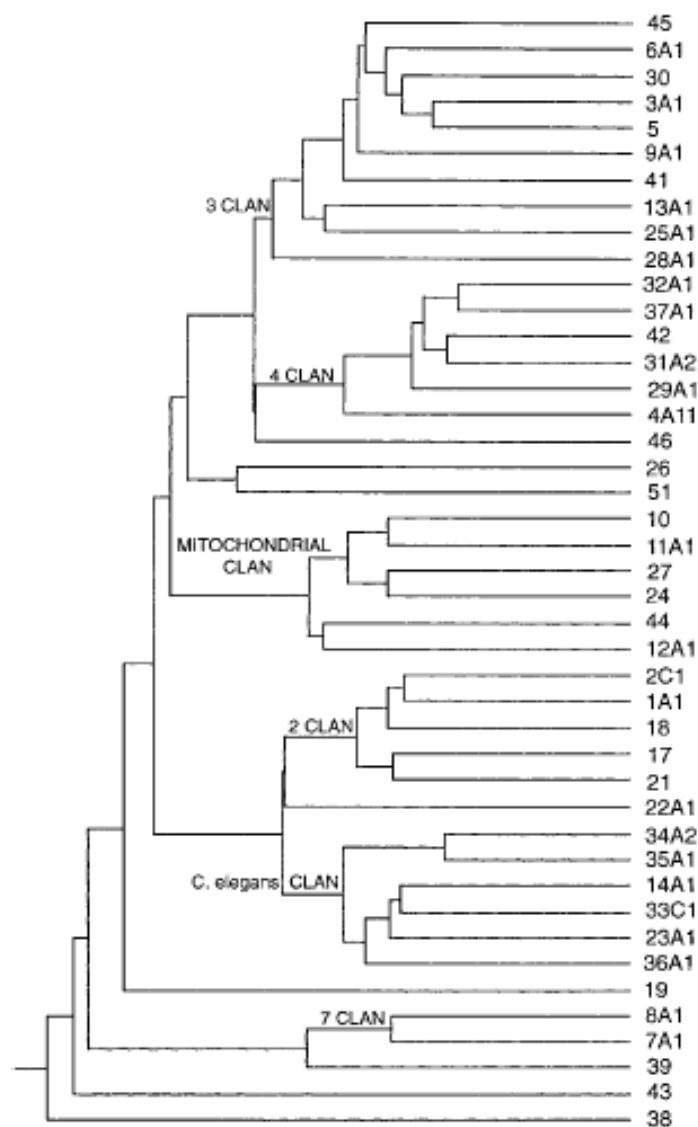


Figure 1.10 : Exemple d'arbre phylogénétique (phylogenetic tree) : 43 familles de cytochromes P450 animaux, avec une séquence pour chaque famille. La dénomination « clan » est utilisée pour des groupes de familles de cytochromes P450, qui représentent des gènes qui dérivent probablement d'un ancien gène originel commun (Nelson, 1999).

Le CYP1A2, par contre, est exprimé presque uniquement dans le foie et l'expression extra hépatique est très basse. Les réactions catalysées par le CYP1A2 sont d'un côté l'hydroxylation du 17- β -œstradiol, et d'autre côté la N-hydroxylation d'amines cancérogènes et d'amines hétérocycliques, qu'on retrouve dans la fumée de cigarette et dans les aliments grillés. Parmi les médicaments métabolisés par le CYP1A2 il y a la phénacétine, la tacrine, le tamoxifène et la warfarine.

Le CYP1B1 est le seul membre de la sous-famille CYP1B exprimé chez l'homme. Il est exprimé constitutivement dans plusieurs tissus, et il est inductible par le TCDD. Chez le rat, le CYP1B1 est responsable de l'oxydation du 7,12-diméthyl benzo[a]anthracène.

* Famille *CYP2* (Guengerich, 1995)

La famille la plus nombreuse chez les humains (et les mammifères) est la *CYP2*, avec 16 gènes.

Le CYP2A6 est le seul membre de la sous-famille CYP2A exprimé dans le foie humain, et son niveau est assez bas. Il catalyse un nombre de réactions parmi lesquelles la O-dééthylation de la 7-ethoxycoumarine, la bioactivation des cancérogènes 6-aminochrysène et aflatoxine B₁, et l'activation des nitrosamines (Yamazaki, 1992), la 7-hydroxylation de la coumarine et la métabolisation de la nicotine.

CYP2B6 est exprimé essentiellement dans le foie humain, mais le niveau d'expression est très bas. Cependant, il catalyse la bioactivation d'un cancérogène comme le 6-aminochrysène et des autres pro-cancérogènes (Mimura, 1993).

La sous-famille des CYP2C est la plus complexe des cytochromes P450 humains. Une grande partie des médicaments actuellement dans le commerce sont métabolisés par les cytochromes P450 de la sous-famille 2C.

Le CYP2C8 est exprimé dans le foie, et il est considéré responsable de différentes réactions, comme la 6- α -hydroxylation du taxol, la 4-hydroxylation de rétinol et de l'acide rétinoïque.

Le CYP2C9 est le plus abondant membre de la sous-famille des CYP2C dans le foie. Il catalyse nombreuses réactions, comme les hydroxylation du tolbutamide, du diclofénac, de l'acide tiénilique, de la phénytoïne (en position 4'), et de la (S)-warfarine (en position 7). Les résultats d'études *in vivo* montrent que le CYP2C9 est inductible par les barbituriques et la rifampicine (Zilly, 1977).

La séquence protéique du CYP2C10 est très similaire à celle du CYP2C9 (et est considéré une variante allélique) et les différences entre les activités catalytiques des deux enzymes sont très petites (Srivastava, 1991).

Le CYP2C18 semble être peu exprimé et seul l'expression hétérologue a permis de lui trouver comme substrats le tolbutamide et l'acide tiénilique. Cependant, bien que son ADN messager soit facile à mettre en évidence dans plusieurs tissus (peau, foie), sa protéine est exprimée à des niveaux inférieurs aux limites de détection des immunotransferts et avec une haute variabilité interindividuelle de l'expression (Furuya, 1991).

Le CYP2C19 a d'abord été isolé comme la (S)-méphénytoïne 4'-hydroxylase. Mais d'autres substrats de cette isoforme sont l'oméprazole, le nirvanol et le diazepam.

Le CYP2D6 est un enzyme polymorphique impliqué dans le métabolisme de nombreux médicaments (clozapine, dextrométhorphan, halopéridol, paroxétine, timolol, par exemple), et plusieurs inhibiteurs ont aussi été identifiés, comme par exemple la quinidine. Les substrats et inhibiteurs les plus spécifiques pour le CYP2D6 ont la caractéristique commune d'un azote basique.

Le CYP2E1 est présent principalement dans le foie, mais il a été trouvé aussi dans des autres tissus. Le niveau d'expression dans le foie a une haute variabilité interindividuelle, et il est beaucoup plus élevé chez les alcooliques. Le nombre de médicaments métabolisés par le CYP2E1 est limité, des exemples sont l'acétaminophène, la caféine, le chlorzoxazone, l'halothane et l'enflurane. Les cancérogènes métabolisés par le CYP2E1 sont plus nombreux et ils sont principalement des petites molécules. Cette enzyme pourrait avoir un rôle dans l'alcoolisme, la cancérogenèse (Yamazaki, 1992), et dans une maladie comme le diabète (Koop, 1992).

Récemment on a identifié de nouvelles isoformes de cytochromes P450 de la famille CYP2 chez l'homme : CYP2J2, CYP2S1, CYP2R1, CYP2U1. Les fonctions de certaines de ces isoformes sont encore inconnues : les substrats spécifiques du CYP2S1 (pourtant capable d'hydroxyler l'acide *all-trans* rétinolique) (Smith, 2003) ou du CYP2W1, par exemple, n'ont pas été déterminés. Par contre, on a récemment identifié les substrats du CYP2R1 (responsable de la 25-hydroxylation de la vitamine D₃) (Cheng, 2003) et du CYP2U1 (qui hydroxyle les acides gras à chaîne longue, comme l'acide arachidonique) (Chuang, 2004). Le CYP2J2 métabolise l'acide arachidonique en époxydes (Wu, 1996) et on connaît plusieurs médicaments antihistaminiques comme substrats (ébastine, terféndine et astémizole) (Matsumoto, 2002 ; Hashizume, 2002).

* Famille CYP3 (Guengerich, 1995)

Chez l'homme la famille CYP3 se compose seulement de quatre membres : CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7, CYP3A43.

Le CYP3A4 est le cytochrome P450 le plus abondant dans le foie humain. Il est aussi exprimé dans d'autres tissus comme le poumon, et l'intestin grêle. Il métabolise une grande variété de substrats, des médicaments, des substances d'origine végétale et différents substrats endogènes, comme les stéroïdes et les acides biliaires. Le CYP3A4 a une importance fondamentale dans le métabolisme des xénobiotiques.

Par contre le rôle du CYP3A5 dans le métabolisme des xénobiotiques est apparemment marginal (Westlind-Johnsson, 2003). Il est aussi exprimé dans le foie.

Les autres deux cytochromes P450 de la famille *CYP3A* sont le CYP3A7, exprimé seulement dans le foie foetal, et le CYP3A43 dont l'expression de certains génotypes a été associée au développement du cancer de la prostate, suggérant une implication possible de cette isoforme dans le métabolisme de la testostérone (Zeigler-Johnson, 2004).

Le système de régulation de l'expression des cytochromes de la famille *CYP3A* peut être activé par des xénobiotiques, provoquant une expression excessive de ces cytochromes P450. La synthèse des CYP3A est initiée par un facteur de transcription, le pregnane X récepteur (PXR) qui est activé par liaison avec des petites molécules (stéroïdes ou xénobiotiques). Le PXR active la transcription des gènes de la famille *CYP3A*, mais cette activation est aussi contrôlée par un autre facteur de transcription, le « constitutive androstane récepteur » (CAR).

* Famille *CYP4* (Guengerich, 1995)

La famille *CYP4* est composée de 12 membres, dont une grande partie est impliquée dans le métabolisme des acides gras, de l'acide arachidonique, des prostaglandines, des leucotriènes et des eicosanoïdes.

Le CYP4A11 se trouve dans les reins, et il est responsable de l'hydroxylation ω et $\omega-1$ des acides gras. Le CYP4B1 est une isoforme extrahépatique, exprimé dans le poumon.

L'importance de cette famille de cytochromes P450 dans le métabolisme des médicaments paraît marginale, sauf le CYP4F12 capable de métaboliser un substrat exogène, l'ébastine (Hashizume, 2002) et ses analogues (terfénadine, terfénadone).

1.4.c Le Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)

Le cytochrome P450, le plus abondant dans le foie humain, est le CYP3A4, constituant environ 35% de la quantité totale des cytochromes P450. Les cytochromes P450 de la famille CYP2C représentent environ le 20% du total et le CYP1A2 environ le 15% (Shimada, 1994).

Le CYP3A4 a été initialement identifié comme l'enzyme nifedipine oxydase, et appelé P-450NF (Guengerich, 1986), son gène a été isolé (Beaune, 1986) et localisé sur le chromosome 7 (Nebert,

1987). Le cytochrome P-450NF (aussi appelé P-450hPCN1 (Gonzalez, 1988)) a été associé au métabolisme des hormones stéroïdiennes (6- β -hydroxylation de la testostérone, en particulière) (Waxman, 1988), puis un grand nombre de substrats du CYP3A4 ont été identifié ; environ la moitié des molécules thérapeutiques communément utilisées sont métabolisées par le CYP3A4.

Les études concernant le CYP3A4 sont en continuelle augmentation surtout grâce à l'expression hétérologue des cytochromes P450. L'expression hétérologue du CYP3A4 de foie humain a été initialement développée dans la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) (Renaud, 1990). Puis plusieurs systèmes d'expression différents ont été utilisés : les cellules lymphoblastoïdes humaines (Crespi, 1991) ; les bactéries, en particulier *Escherichia coli* (Gillam, 1993) ; les cellules d'insecte infectées avec un baculovirus (*Autographa californica*) contenant l'ADNc du CYP3A4, qui est le système le plus productif pour cette isoforme (Buters, 1994).

Les études sur le CYP3A4 et ses substrats et inhibiteurs ont révélé de nombreuses caractéristiques du site actif de l'enzyme et ont conduit à la construction de modèles dans le but de prévoir les interactions entre le CYP3A4 et ses substrats, inhibiteurs ou inhibiteurs suicides. Les premiers modèles (Lewis, 1996) ont été construits à partir de la structure du CYP102 (P450BM-3), un cytochrome P450 bactérien soluble, le premier cytochrome P450 de classe II (c'est-à-dire possédant une réductase à FAD et FMN) dont la structure a été déterminée aux rayons X (Ravichandran, 1993).

Un modèle ultérieur a été bâti à partir de la structure (sur les coordonnées cristallographiques) de quatre cytochromes P450 bactériens et solubles : P450 BM-3, P450cam, P450terp et P450eryF. La séquence des acides aminés du CYP3A4 a été alignée aux séquences des cytochromes P450 dont la structure aux rayons X était connue, et on a calculé les coordonnées du modèle (Szklarz, 1997).

Grâce à la modélisation et aux nombreuses études pour définir la structure du site actif du CYP3A4, d'importants résultats ont été obtenus, comme l'identification de plusieurs sites de liaison dans le site actif. La capacité du CYP3A4 d'accueillir en même temps plusieurs ligands dans le site actif, a été démontrée à travers le phénomène d'activation enzymatique par liaison simultanée de la 7,8-benzoflavone et du phénanthrène (Shou, 1994). Ensuite, trois sites de liaison distincts ont été définis pour la testostérone, la α -naphthoflavone et le midazolam (Hosea, 2000). Les études qui ont amené à cette conclusion, ont été effectuées en utilisant un oligopeptide (YPFP-NH₂) capable d'inhiber différemment l'activité catalytique du CYP3A4 pour les trois composés cités (testostérone, α -naphthoflavone et midazolam).



Figure 1.11 : Structure générale du CYP3A4. La partie N-terminale est colorée en bleu dégradant au vert, jaune et rouge vers la partie C-terminale. L'hème et l'atome de fer sont évidents au centre de la structure (Williams, 2004).

Les structures aux rayons X du CYP3A4 cristallisé libre et complexé avec la métyrapone ou la progestérone sont disponibles depuis 2004 (Williams, 2004 ; Yano, 2004). Comme le CYP3A4 est un enzyme transmembranaire, pour permettre la solubilisation et la cristallisation du cytochrome P450, la séquence protéique a été tronquée dans la partie N-terminale, la portion

transmembranaire de l'enzyme natif. La structure générale du CYP3A4 est similaire à celles des autres cytochromes P450 déjà connues : elle est composée d'une partie N-terminale à structure secondaire prédominante à feuillets β , et d'un plus grand domaine C-terminal qui contient le site actif et l'hème, surtout constitué d'hélices α (figure 1.11). L'hème est lié à la chaîne protéique par une liaison de coordination de l'atome de Fer avec le soufre d'une cystéine (Cys⁴⁴²) et des liaisons hydrogène entre la porphyrine et les chaînes latérales de arginines et une thréonine du site actif.

Dans la structure de Williams, l'interaction avec des substrats comme la métyrapone et la progestérone ne modifie apparemment pas beaucoup la conformation du cytochrome P450 par rapport à la structure sans substrat, mais les ligands sont trop loin du centre métallique pour pouvoir être métabolisés (position non productive).

La structure du CYP3A4 montre un site actif très ample et capable d'accueillir plusieurs molécules de taille moyenne en même temps, ou des molécules très volumineuses et encombrantes, comme la cyclosporine (qui a un poids moléculaire de 1201) (Aoyama, 1989). Dans ce site actif peuvent donc prendre place une grande variété de substrats ayant des dimensions et caractéristiques très différentes, ainsi que divers inhibiteurs et substrats suicides.

1.5 Inhibition des Cytochromes P450

L'inhibition des enzymes du métabolisme, et spécialement des cytochromes P450, intéresse beaucoup l'industrie pharmaceutique pour deux raisons. D'une part, l'inhibition enzymatique est à l'origine des interactions médicamenteuses, lorsque deux médicaments ou plus sont administrés au même temps ; d'autre part, certaines isoformes particulières de cytochromes P450 peuvent être considérées comme des cibles thérapeutiques. Un exemple est le CYP19 (aromatase) (Koymans, 1995) qui catalyse l'aromatation des androgènes en estrogènes et dont l'inhibition est utile dans le traitement du cancer du sein (Brueggemeier, 2001). L'inhibition de l'aromatase est un traitement largement utilisé en clinique, et il y a nombreuses études cliniques sur l'utilisation des composés avec un tel mécanisme d'action (des exemples récentes sont : Brueggemeier, 2005 ; Carlini, 2005 ; de Ziegler, 2005), mais l'inhibition d'autres isoformes de cytochromes P450 comme cibles thérapeutiques n'est pas encore en pratique clinique.

1.5.a Inhibition réversible

A) Inhibition Compétitive

Un inhibiteur compétitif est un composé dont les caractéristiques structurales lui permettent de rentrer dans le site actif du cytochrome P450, d'établir une interaction avec l'enzyme et d'en bloquer réversiblement l'activité enzymatique (Guengerich, 1999).



La réaction d'inhibition réversible (Réaction 1.2) est décrite par une constante thermodynamique K_i qui est une constante de liaison entre l'enzyme et l'inhibiteur. Les constantes k_1 et k_{-1} sont les paramètres cinétiques décrivant l'interaction enzyme-inhibiteur. Les trois constantes sont liées par la relation : $K_i = k_1/k_{-1}$.

L'inhibition compétitive est un phénomène relativement commun dans les études du métabolisme de médicaments. Elle peut être à l'origine des interactions médicamenteuses chez les patients traités avec plusieurs médicaments à la fois.

Un cas particulier de l'inhibition réversible est l'inhibition lente et forte. Les inhibiteurs qui causent ce type d'inhibition se lient à l'enzyme très lentement, et ils se dissocient de l'enzyme encore plus lentement. L'inhibition est réversible, et donc l'élimination de l'inhibiteur du site actif (par dialyse, par exemple) peut rétablir l'activité enzymatique. Des causes possibles de la liaison lente et forte peuvent être des changements de la conformation de l'enzyme provoqués par la liaison à l'inhibiteur, ou des changements de l'état de protonation de la protéine (Silverman, 1995).

B) Inhibition Non-compétitive et inhibition incompétitive

Les inhibiteurs non-compétitifs et incompétitifs se lient à l'enzyme dans le site actif, mais pas au même site que le substrat. L'inhibiteur non-compétitif se lie au site actif de l'enzyme libre (aucun substrat lié), par contre l'inhibiteur incompétitif se lie seulement au complexe enzyme-substrat. Les inhibitions non-compétitive et incompétitive pures sont des phénomènes rares ; chez les cytochromes P450, est très commune l'inhibition mixte : en fait, dans le cas du CYP3A4, il est assez rare que se vérifie l'inhibition compétitive pure.

C) Analogues de l'état de transition

Les analogues de l'état de transition sont des inhibiteurs qui ont une structure similaire à l'état de transition d'une réaction enzymatique. Ils se lient à l'enzyme très fortement et rapidement (mais non d'une façon covalente) et ils s'en dissocient très lentement. L'inhibition n'est pas dépendante du temps, et elle est réversible.

☆ Interactions cytochromes P450–ligands et états de spin

Les cytochromes P450 au repos existent comme un mélange de deux formes en équilibre : une avec le centre métallique sous forme de Fe(III), hexacoordonné, à bas spin, et l'autre avec l'atome de fer (Fe(III)) pentacoordonné, et à haut spin (figure 1.9 (a) et (b)).

L'interaction du cytochrome P450 avec différents composés peut provoquer un changement d'équilibre entre les deux formes et la prédominance d'une des deux. Le déplacement de l'équilibre est détectable par spectrophotométrie UV-vis : le maximum d'absorbance dans la région de Soret (région d'absorption autour des 400 nm) est dans une position différente en fonction de l'état de spin, majoritairement haut ou bas selon le mode d'interaction du cytochrome P450 avec des ligands différents. La forme à bas spin présente un maximum d'absorbance à 420 nm, et la forme à haut spin a un maximum à 390 nm.

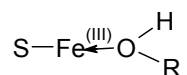
Ces maximums d'absorbance sont beaucoup plus visibles sur les spectres de différence : au spectre du cytochrome P450 en présence de ligand on soustrait le spectre du cytochrome P450 en absence de ligand.

~ L'interaction avec un substrat ou inhibiteur qui se lie dans le site actif et provoque le déplacement du sixième ligand, cause un déplacement de l'équilibre haut spin–bas spin vers la forme avec l'atome de fer pentacoordonnée à haut spin. Cette modification de l'équilibre se reflète, dans le spectre de différence du cytochrome P450. Le spectre, appelée de type I, est caractérisée par un maximum à 385-390 nm et un minimum à une longueur d'onde de 420 nm (figure 1.12 (A)). De nombreux composés donnent un spectre de type I : des exemples sont la chlorpromazine, l'œstradiol, la testostérone (Schenkman, 1967).

~ Un substrat ou inhibiteur qui dans sa structure chimique présente un groupe aminé, peut se lier au cytochrome P450 par une liaison de coordination de l'atome d'azote avec l'atome de fer. Cette interaction provoque un déplacement de l'équilibre haut spin–bas spin vers l'état avec le fer hexacoordonné et à bas spin. Le spectre de différence résultant est appelé de type II. Il présente un minimum vers 390 à 405 nm, et un maximum à 425-435 nm (figure 1.12 (B)). Parmi les composés qui donnent des spectres de type II, il y a la nicotine, la nicotinamide (Schenkman, 1967), la pyrrolidine, la pyridine et ses analogues, les amines en général (Mailman, 1974).

~ L'interaction du cytochrome P450 avec un ligand ayant une fonction alcoolique ou éther, provoque un changement de l'équilibre haut spin–bas spin vers la forme hexacoordonnée, à

bas spin ; on suppose que le complexe qui se forme par cette interaction a comme sixième ligand l'oxygène de l'alcool :



Le spectre de différence associée à ce déplacement de l'équilibre est appelé spectre de « reverse type I », et il présente un maximum à 420 nm et un minimum à 388-390 nm (figure 1.12 (C)). Des exemples de composés qui provoquent un spectre de type I reverse sont la phénacétine (Schenkman, 1972) et la warfarine (Fasco, 1977).

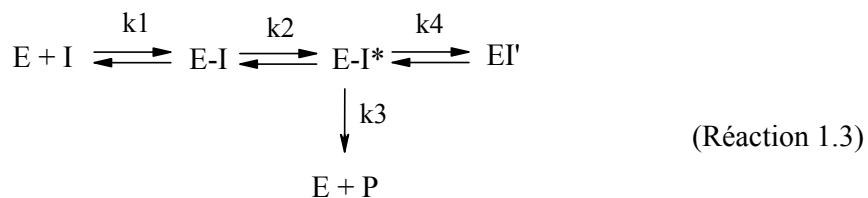
Toutes les interactions décrites sont réversibles et l'amplitude du maximum d'absorbance, dépend de la proportion du fer des cytochromes P450 qui se trouve dans un état à haut ou bas spin. L'amplitude des spectres de différence dépend de la concentration en ligand qui interagit avec les cytochromes P450, et suit une loi de Michaelis-Menten, qui permet de déterminer une constante spectrale K_s (Schenkman, 1981).

1.5.b Inhibition irréversible

Les inhibiteurs réversibles, dont on a parlé, causent une inhibition de l'enzyme sans nécessiter de transformation catalytique. Par contre, on admet que pour avoir une inhibition irréversible, une modification covalente de la partie protéique ou du groupe prosthétique de l'enzyme (Walsh, 1982) ou une liaison de coordination très forte au fer est nécessaire. Les composés qui, après une transformation catalytique, inactivent l'enzyme qui les a métabolisés, sont définis comme des « substrats suicides » (en anglais « mechanism based inhibitors »).

Des caractéristiques importantes des substrats suicides sont : l'enzyme catalyse la formation de la molécule qui va l'inactiver ; l'inactivation est le résultat d'une réaction entre l'enzyme et des espèces produites dans son propre site actif (Ortiz de Montellano, 1988).

Une réaction d'inactivation suicide peut être représentée par le schéma général suivant :



où E est l'enzyme, I est l'inactivateur suicide, E-I* est un intermédiaire activé du complexe initial, P est le produit de la réaction enzymatique et EI' est l'enzyme inactivé.

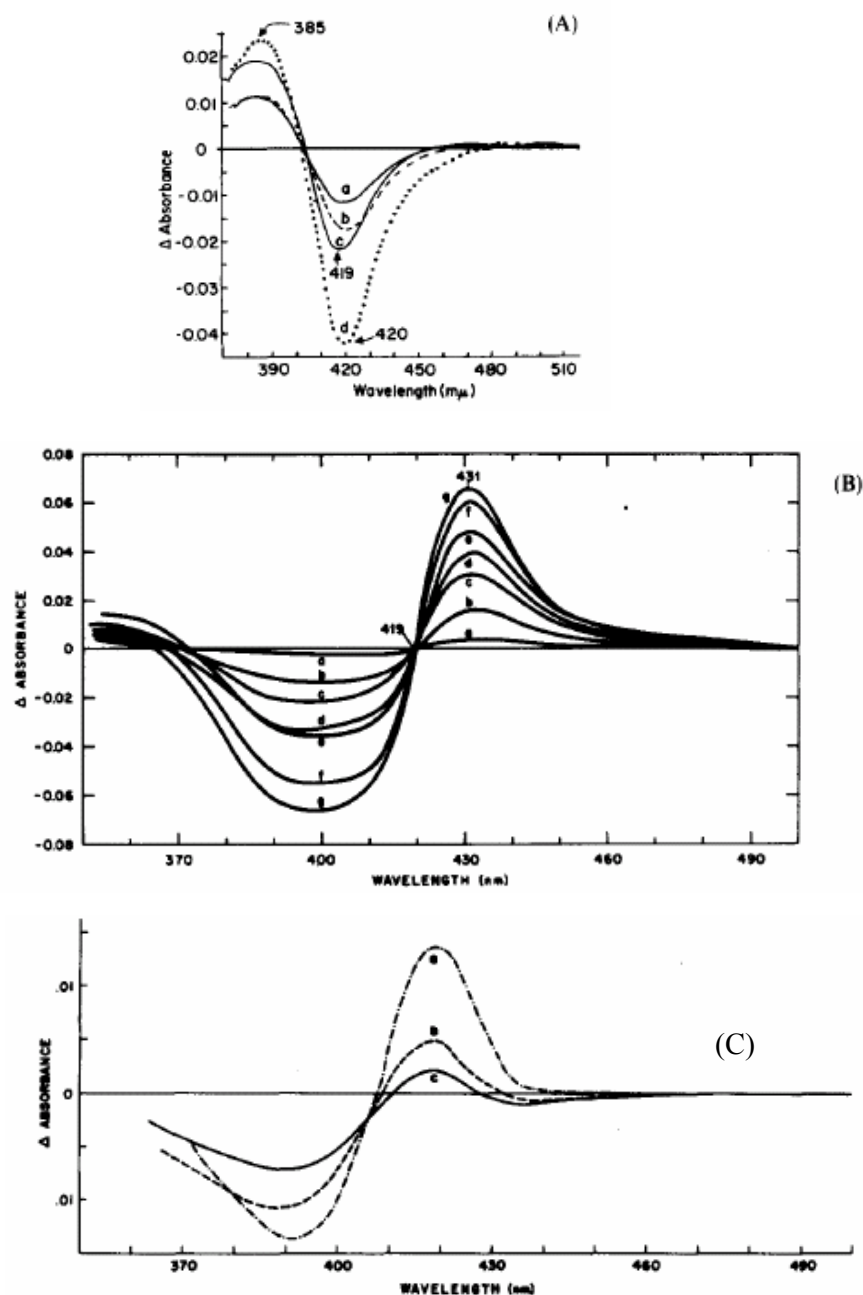


Figure 1.12 : Spectres de différence UV-vis, dans la région de Soret, des cytochromes P450 avec le fer dans les deux états de spin. (A) Cytochromes P450 avec le Fe(III) pentacoordonné, à haut spin ; spectres (de type I) obtenus par addition aux microsomes de foie de rat de substrats diverses (a=aminopyrine, b=amobarbital, c=hexobarbital, d=SKF525-A). (B) Cytochromes P450 avec le Fe(III) hexacoordonné, à bas spin ; spectres (de type II) obtenus par addition d'aniline en concentrations croissantes aux microsomes de rat ; (C) Cytochromes P450 avec le Fe(III) hexacoordonné, à bas spin ; spectres (de « reverse type I ») obtenus par addition de différents alcools aux microsomes (a=n-butanol, b=éthanol, c=méthanol). (Schenkman, 1981)

Les substrats suicides peuvent se lier à l'apoprotéine, ou au groupe prosthétique des cytochromes P450. La liaison du métabolite réactif à l'hème détruit le centre fonctionnel de l'enzyme, qui est par conséquent inactivé. Si l'intermédiaire réactif se lie à la chaîne protéique, l'activité enzymatique n'est pas inévitablement compromise. Il y a une perte d'activité catalytique si la modification covalente sur l'apoprotéine :

- › empêche l'entrée du substrat dans le site actif, son positionnement par rapport à l'hème, ou la capacité de l'enzyme d'accepter les électrons ;
- › facilite la dissociation de l'hème ;
- › favorise le fonctionnement découplé de l'enzyme, ce qui peut apporter des dommages secondaires ;
- › déstabilise la structure protéique au point qu'elle est plus rapidement dégradée.

L'identification définitive d'une réaction d'inactivation suicide des cytochromes P450 est parfois difficile, à cause de leur basse spécificité pour les substrats et de leur capacité à produire des métabolites hydroxylés qui diffusent facilement hors du site actif. Donc, pour identifier les substrats suicides, on a définis des critères expérimentaux (Silverman, 1995) :

- L'inhibition est dépendante du temps : même quand le complexe cytochrome P450-inactivateur (E-I, voir Réaction 1.3) se forme rapidement, la réaction qui convertit l'inactivateur dans la forme réactive nécessite du temps. Par conséquent, la perte d'activité du cytochrome P450 résultante dépend du temps.
- L'inhibition est dépendante des cofacteurs, le NADPH dans le cas des cytochromes P450.
- La réaction d'inactivation est saturable : la vitesse d'inactivation augmente proportionnellement à la quantité d'inactivateur qui interagit avec l'enzyme. Mais quand la quantité d'inactivateur dans le mélange d'incubation est telle que toutes les molécules de cytochrome P450 sont saturées, la vitesse d'inactivation ne peut plus augmenter, même par additions supplémentaires d'inhibiteur suicide.
- Protection par un substrat : l'inhibiteur suicide a besoin d'être métabolisé par le cytochrome P450 pour l'inactiver. Donc, l'addition d'un substrat ou d'un inhibiteur compétitif et réversible, peut ralentir la vitesse d'inactivation.
- L'inhibition est irréversible : dans le plus part des cas, l'inhibition suicide a lieu par liaison covalente au cytochrome P450 ; une autre possibilité est la formation de liaisons de coordination très fortes et stables, qui se dissocient difficilement. Le rinçage des enzymes et la dialyse ne peuvent pas rétablir l'activité enzymatique perdue.

- La stœchiométrie d'inactivation est de 1 : 1 : les inhibiteurs suicides sont métabolisés en intermédiaires réactifs par action des cytochromes P450, donc une molécule d'inactivateur qui se lie au site actif de l'enzyme suffit pour l'inactiver. La stœchiométrie de liaison enzyme : substrat suicide est donc de 1 : 1.
- L'inactivation a lieu avant la libération des intermédiaires réactifs : les inhibiteurs suicides inactivent l'enzyme avant sortir du site actif.

Les réactions d'inactivation suicide peuvent être décrites aussi par des paramètres, déterminés expérimentalement, et qui donnent des indications sur la puissance des inhibiteurs suicides. Le processus d'inactivation suit une cinétique de premier ordre (ou cinétique exponentielle simple), caractérisé par les constantes suivantes : k_{inact} , la vitesse maximale de la réaction d'inactivation ; K_I , la concentration d'inactivateur nécessaire pour inhiber la moitié de l'enzyme ; $t_{1/2}$, la demie vie de l'inactivateur.

Un paramètre très important dans la description d'un substrat suicide est le rapport de partition (partition ratio). Ce paramètre est une quantification de l'efficacité de l'inhibiteur suicide. Il représente le rapport k_3/k_4 (Réaction 1.3), c'est-à-dire le nombre de molécules d'inactivateur métabolisées et relâchées par l'enzyme pour chaque molécule métabolisée qui inactive l'enzyme même.

1.6 Rôle de l'inhibition des Cytochromes P450 dans le métabolisme des médicaments

Les interactions médicamenteuses sont définies comme l'altération de l'efficacité ou de la toxicité d'un médicament par action d'un autre xénobiotique (Ito, 1998).

La gravité clinique de toute interaction médicamenteuse dépend de différents facteurs liés au médicament, au patient et à la modalité d'administration ; l'interaction médicamenteuse est plus dangereuse si le médicament co-administré a une fenêtre thérapeutique étroite. L'intensité des conséquences des interactions médicamenteuses est très variable d'un individu à l'autre ; elle dépend des différences interindividuelles, du contenu en cytochromes P450 (hépatiques et extra hépatiques), des conditions du patient, de son histoire clinique, et éventuellement de l'âge (Dresser, 2000).

Les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ont une basse spécificité pour les substrats et une grande adaptabilité. Par conséquent, un nombre relativement petit de ces enzymes métaboliques est responsable de la biotransformation de la plupart des médicaments et xénobiotiques. La prise d'un médicament qui provoque l'augmentation ou la

diminution de l'activité catalytique d'une seule isoforme de cytochrome P450, peut modifier de façon significative le métabolisme de plusieurs autres composés.

L'inhibition (réversible ou suicide) et l'induction des cytochromes P450 sont donc des causes communes des interactions médicamenteuses.

1.6.a Cytochromes P450 et interactions médicamenteuses : l'induction

L'induction est un processus (lent) qui provoque une augmentation de la production d'une isoforme de cytochromes P450 et une augmentation de la capacité métabolique du foie. Ceci provoque l'augmentation de la biotransformation des composés substrats de l'isoforme induite, une diminution progressive de leur concentration plasmatique et l'augmentation de la production de leurs métabolites. Il a été démontré que plusieurs isoformes de cytochromes P450 humains sont inductibles : CYP1A1, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4, CYP2B6 et CYP1A2 sont les principales.

Dans le cas des médicaments, les conséquences de l'induction peuvent être dangereuses pour les patients. Une diminution de la concentration sanguine du composé actif peut provoquer une diminution de sa concentration au niveau de la cible thérapeutique, ce qui se traduit dans une diminution de l'efficacité pharmacologique du médicament. L'induction des cytochromes P450 provoque aussi une augmentation de la production de métabolites du composé actif. Ces métabolites peuvent être des composés réactifs potentiellement dangereux pour le patient ou des composés avec une activité pharmacologique propre. L'augmentation de la concentration de ces molécules peut provoquer des effets toxiques ou des effets secondaires négatifs (Lin, 1998).

Les premières observations de l'induction des enzymes hépatiques du métabolisme (dans le foie du rat) sont très anciennes (Brown, 1954) et les substances considérées comme responsables de l'induction étaient des peroxydes des stéroïdes. Dans les années suivantes, l'induction de l'activité et de la synthèse des enzymes métaboliques du réticulum endoplasmique (ER) a été démontrée, après administration aux animaux de laboratoire de phénobarbital (Remmer, 1963), de prégénolone-16 α -carbonitrile (PCN) (Lu, 1972), de 3-méthylcholanthrène (3-MC) (Poppers, 1975). Les chercheurs avaient aussi remarqué que l'induction provoquée *in vivo* dans les animaux de laboratoire par composés différents provoquait l'augmentation de la métabolisation de substrats différents : ceci était dû à l'induction d'isoformes différentes de cytochromes P450 par des composés différents (Conney, 1967).

En clinique, l'induction des cytochromes P450 est un problème particulièrement commun dans le traitement de l'épilepsie, car certains des médicaments employés sont des inducteurs : les

barbituriques (en particulier le phénobarbital), les anticonvulsifs (dérivés des hydantoïnes), les calmants (chlorpromazine, promazine, chlordiazepoxyde) (Brown, 1973). L'induction des cytochromes P450 chez le nouveau-né a été expliquée par l'exposition prénatale (chez la mère) par un médicament antiépileptique, le primidone/phenobarbital (Rating, 1983).

1.6.b Cytochromes P450 et interactions médicamenteuses : l'inhibition

Les interactions médicamenteuses sont une conséquence évidente aussi de l'inhibition (compétitive ou irréversible) des cytochromes P450.

L'inhibition d'une ou plusieurs isoformes de cytochromes P450 par un composé, cause une diminution du métabolisme des autres molécules biotransformées par les isoformes inhibées. Cette diminution provoque un ralentissement de la détoxification et élimination des molécules et une accumulation dans l'organisme. La concentration de ces molécules peut augmenter jusqu'à arriver à des niveaux toxiques, dans certains cas. L'accumulation de médicaments dans l'organisme est dangereuse surtout quand ces médicaments ont un index thérapeutique faible (Lin, 1998).

En clinique, les conséquences de l'inhibition des cytochromes P450 sont généralement négatives, et elles provoquent des symptômes graves chez les patients (Dresser, 2000). Mais il y a des cas où l'inhibition du métabolisme d'un médicament par les cytochromes P450 est exploitée pour obtenir des effets bénéfiques.

L'inhibition des cytochromes P450 peut être considérée comme utile quand elle permet d'obtenir une augmentation de la biodisponibilité de médicaments, et d'améliorer son efficacité.

C'est le cas de deux molécules antirétrovirales pour le traitement des patients infectés par le HIV-1 : le ritonavir et le saquinavir. La coadministration de ces deux médicaments augmente la biodisponibilité du saquinavir, car le ritonavir inhibe de façon suicide le CYP3A4, qui normalement détruirait une grande quantité de saquinavir par effet de premier passage (Merry, 1997).

L'augmentation de la biodisponibilité d'un médicament permet d'en utiliser des doses plus basses, et par conséquent de réduire le coût thérapeutique. La diminution des doses et du coût est obtenue par exemple dans le cas de la cyclosporine (médicament contre le rejet des transplantations) coadministrée avec du kétoconazole, un inhibiteur compétitif du CYP3A4 (First, 1993).

Plus fréquemment, dans la littérature on retrouve des exemples d'inhibition des cytochromes P450 qui provoquent des interactions médicamenteuses avec conséquences négatives chez les patients.

Un exemple de conséquence négative et grave est la torsade de pointe, une variété d'arythmie ventriculaire très grave, qui survient sur fond de bradycardie, lorsqu'il existe des troubles majeurs de la repolarisation, avec allongement important de l'espace QT. Elle a été observée suite à la coadministration des inhibiteurs du CYP3A4 (kétoconazole et itraconazole) ou d'inhibiteurs suicides du CYP3A4 (clarithromycine, diltiazem, jus de pamplemousse) avec des médicaments qui ont comme effet secondaire l'inhibition des canaux potassiques du cœur (« hERG channels »), comme la terfénaire (Honig, 1992 ; Monahan, 1990), l'astémizole (Tsai, 1997), le cisapride (Sekkarie, 1997 ; Gross, 1999). L'augmentation excessive de la concentration plasmatique de ces médicaments provoque des troubles de la repolarisation, la mauvaise conduction des impulsions électriques dans le myocarde et donc la torsade de pointe, éventuellement fatale.

Des autres conséquences graves sont provoquées par inhibition des cytochromes P450, impliquant les dihydropyridines, antagonistes des canaux du calcium utilisées dans le traitement de l'hypertension. Ces molécules sont des substrats du CYP3A4. On connaît des interactions entre l'itraconazole (un inhibiteur du CYP3A4) et la dihydropyridine fêlodipine (Jalava, 1997). La biodisponibilité orale de la fêlodipine est notamment augmentée par coadministration avec l'itraconazole, et cette augmentation provoque l'hypotension.

Un autre composé à effet antihypertensif est le mibéfradil, qui a été retiré du marché à cause des interactions avec les dihydropyridines et les β -bloquants, souvent coadministrés dans le traitement des pathologies cardio-vasculaires. Ces interactions provoquent une bradycardie et une hypotension qui met en péril la vie des patients (Mullins, 1998).

Pour pouvoir prévenir les conséquences de l'inhibition des cytochromes P450 chez les patients, ont été créés des modèles mathématiques qui permettent de faire des prévisions sur la gravité des interactions médicamenteuses *in vivo*, sur la base des données *in vitro* (en utilisant des microsomes de foie ou des hépatocytes). Pour l'inhibition réversible, ces prévisions sont possibles et les résultats de plusieurs modèles ont été confirmés *in vivo* (Davis, 1994 ; Ervine, 1996, Zomorodi, 1995 ; Houston, 2003). Des tels prévisions n'ont été possibles quand les interactions médicamenteuses sont dues à l'inhibition suicide des cytochromes P450, car les effets *in vivo* de cette inhibition sont disproportionnés par rapport aux constantes mesurées *in vitro* (Houston, 2003).

1.6.c Cytochromes P450 et interactions médicamenteuses : l'inhibition suicide

Les conséquences de l'inhibition suicide des cytochromes P450 ne sont pas limitées aux interactions médicamenteuses, dues à l'inhibition irréversible de l'activité enzymatique. Des hépatites auto-immunes ont été décrites suite à l'administration d'inhibiteurs suicides aux patients. Les cytochromes P450, modifiés de façon covalente par l'inactivateur, peuvent provoquer une réponse auto-immunitaire (rare) : le système immunitaire reconnaît les protéines modifiées comme des molécules étrangères (figure 1.13). Plusieurs médicaments sont connus comme responsables de réactions auto-immunitaires.

Un exemple est l'halothane, un anesthésique qui est tenu pour responsable d'une hépatite immuno-induite rare (fréquence 1/35'000). L'halothane est métabolisé par oxydation par les cytochromes P450 dans un intermédiaire très réactif (un halogénure d'acyle), capable de se lier de façon covalente aux protéines du réticulum endoplasmique, et donner des dérivés protéiques trifluoroacétylés. L'hépatite se développe par une réaction du système immunitaire contre les protéines trifluoroacétylées du réticulum endoplasmique (Kenna, 1990), en particulier les cytochromes P450 (Satoh, 1985) et les carboxylestérases (Satoh, 1989). Les autoanticorps sont capables de reconnaître d'un côté les protéines modifiées et d'autre côté les protéines dans leur forme native (Christen, 1993), et en particulier le CYP2E1 (Eliasson, 1996).

Un autre composé impliqué dans le développement d'une hépatite auto-immunitaire est l'acide tiénilique, un médicament diurétique, retiré du marché à cause de son potentiel à provoquer des hépatites (fréquence 1/5'000 à 10'000). Un marqueur de ce type d'hépatite est la présence dans le sérum des patients d'un autoanticorps anti-LKM2 (Homberg, 1984), qui reconnaît les microsomes de foie et de reins de rat, et qui a été reconnu comme spécifique pour le CYP2C9 (Beaune, 1987). Cette isoforme de cytochrome P450 est aussi celle qui catalyse la métabolisation de l'acide tiénilique dans des intermédiaires très réactifs qui inactivent l'enzyme lui-même par liaison covalente à l'apoprotéine (substrats suicides) (López-Garcia, 1994).

Un autre médicament qui provoque une hépatite auto-immune est la dihydralazine, une molécule à action antihypertensive. L'isoforme de cytochrome P450 impliquée dans la métabolisation, inactivation et apparition d'une réponse auto-immunitaire est le CYP1A2 (Roschlau, 1990 ; Bourdi, 1990).

Les anticonvulsifs ont aussi la capacité de donner des hépatites auto-immunes très rares (fréquence < 1/10'000). Il semble que ces médicaments soient métabolisés par les cytochromes P450 dans des produits réactifs qui vont se lier aux protéines du foie de façon covalente. Les

autoanticorps formés reconnaissent un cytochrome P450 de la famille CYP3A ou peut être CYP8 (tromboxane synthase) (Riley, 1993).

En conclusion, l'étude de l'inhibition des cytochromes P450 associés au métabolisme des xénobiotiques est utile soit pour augmenter les connaissances sur ces enzymes, soit d'un point de vue pratique. L'étude de l'inhibition (réversible ou suicide) des cytochromes P450 permet de préciser les mécanismes de la catalyse et d'approfondir (grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques) la connaissance des caractéristiques topologiques des sites actifs des cytochromes P450 (Kent, 2001). L'étude de l'inhibition des cytochromes P450 peut amener à l'identification d'une isoforme comme cible thérapeutique ; l'identification de nouveaux composés inhibiteurs d'une isoforme des cytochromes P450 peut être très utile pour éviter de développer des molécules à action thérapeutique conduisant à des interactions médicamenteuses ou des réactions autoimmunitaires chez les patients.

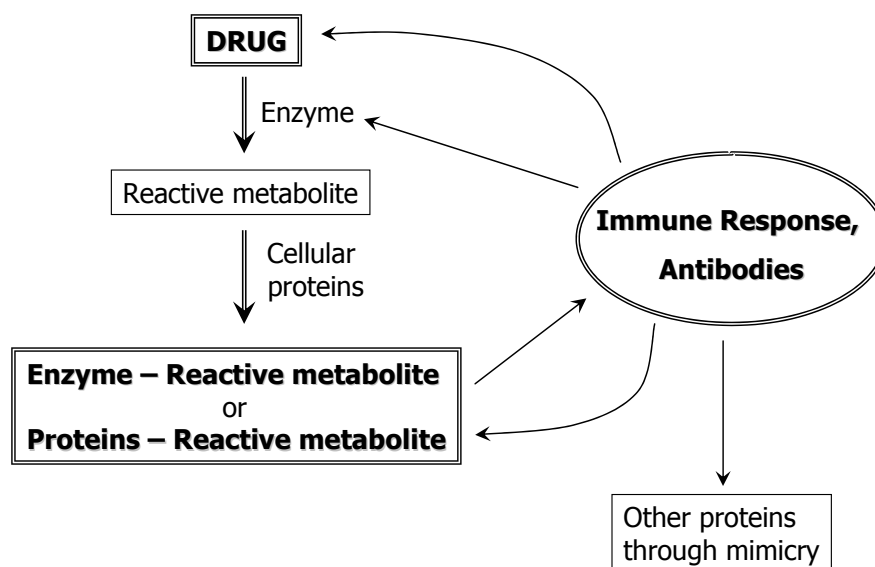


Figure 1.13 : Schéma générale de l'initiation de la réponse auto-immune par les médicaments. Le composé parent est transformé par l'enzyme en un métabolite réactif, qui se lie aux protéines cellulaires ou à l'enzyme métabolique même. Les protéines modifiées provoquent une réponse immunitaire, avec la production d'anticorps qui reconnaissent les protéines liées au métabolite réactif, les protéines non modifiées, d'autres protéines similaires ou le médicament (Beaune, 1997).

1.7 Objectifs de ce travail

À cause de la gravité des conséquences pour les patients de l'inhibition suicide, les principaux objectifs de ce travail de thèse ont été :

A) Le développement de stratégies pour reconnaître et caractériser le plus tôt possible les substrats suicides pendant la recherche et le développement des nouvelles molécules thérapeutiques.

Pour atteindre ce but on a suivi la stratégie suivante :

1. Réaliser une revue exhaustive de la littérature sur les substrats suicides et résumer les informations principales obtenues dans une base de données. La base de données en forme électronique permet la recherche des sous-structures potentiellement capables de donner l'inhibition suicide sur les cytochromes P450. Une telle base de données peut être outil pour les chimistes engagés dans la conception de nouvelles molécules médicamenteuses, et peut servir à éviter le « design » et le développement des molécules dangereuses pour les patients.
 2. Mise au point et validation d'une nouvelle méthode à haut débit pour la détection des inhibiteurs dépendants du temps. La méthode doit être simple et rapide pour permettre l'identification des composés qui inhibent le CYP3A4 de façon dépendante du temps (principale caractéristique des inhibiteurs suicides). Avec ce test on veut aussi arriver à calculer des constantes qui décrivent le processus d'inactivation pour comparer la puissance d'inactivation de différents composés.
 3. Appliquer la nouvelle méthode à des séries de composés. Après avoir mesurée leur capacité de provoquer l'inhibition dépendante du temps sur le CYP3A4, la comparaison des valeurs obtenues pour les constantes d'inactivation permet de déduire des relations structure-activité (SAR) pour l'inhibition suicide.
- B) L'application des deux outils développés (banque de données et méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps) à un projet de recherche, sur les inhibiteurs du récepteur A_{2a} de l'adénosine. Les composés de ce projet ont une sous-structure présente dans la base de données (une alerte structurale) et ils sont capables de provoquer l'inhibition dépendante du temps. On a démontré que deux composés identifiés comme potentiellement dangereux par les deux outils sont effectivement des inhibiteurs suicides du CYP3A4 et ils se lient de façon covalente à ce cytochrome P450.

2. Revue de littérature sur les inhibiteurs suicides

2. Revue de Littérature sur les Inhibiteurs Suicides [Mechanism-Based Inhibitors (MBI)]

2.1. But de la revue et de la base de données

Un composé capable d'inactiver spécifiquement l'enzyme responsable de sa métabolisation est défini comme substrat suicide ou « mechanism-based » inhibiteur. Les caractéristiques fondamentales de l'inactivation suicide sont :

- l'enzyme catalyse la formation de la molécule qui va l'inactiver ;
- l'inactivation est le résultat de la réaction du cytochrome P450 avec des intermédiaires réactifs produits dans son site actif (Ortiz de Montellano, 1988).

Les métabolites réactifs peuvent se lier au cytochrome P450 de trois façons et provoquer l'inactivation de l'activité enzymatique par : liaison covalente des intermédiaires réactifs aux aminoacides de la chaîne protéique ; liaison covalente aux atomes d'azote de la porphyrine du cytochrome P450 ; formation d'un complexe hème – métabolite intermédiaire (« metabolite-intermediate » complex ou MI complex), c'est-à-dire une liaison de coordination très forte sur le fer de la porphyrine, qui reste irréversiblement bloquée compromettant la fonctionnalité de l'enzyme.

Les conséquences de l'inhibition suicide sont graves et dangereuses pour les patients : A côté des interactions médicamenteuses, les cytochromes inactivés et modifiés par liaison covalente des métabolites réactifs sur la chaîne protéique, peuvent être à l'origine de réactions auto-immunitaires. En fait, le cytochrome P450 modifiée peut être identifiée par le système immunitaire comme une protéine inconnue et provoquer une réaction immunitaire. La conséquence de cette réaction est généralement une hépatotoxicité très grave (Watkins, 1990) parfois mortelle (Walton, 1976). On connaît plusieurs médicaments capables de donner ce type de réaction ; un exemple est l'halothane : l'observation de l'hépatotoxicité de cet anesthésique général est relativement ancienne (Walton, 1976), mais plus récemment on a découvert qu'elle est provoquée par une réaction auto-immunitaire contre les protéines trifluoroacétylées des microsomes de foie (Satoh, 1989) et en particulier contre le CYP2E1 (Bourdi, 1996) ; un autre exemple est l'acide tiénilique, qui est métabolisé par le CYP2C9, qu'il inactive par réaction suicide et qui provoque la formation d'anticorps anti-LKM2 (Poupon, 1980 ; Homberg, 1984) reconnaissant spécifiquement le CYP2C9 (Beaune, 1987) ; la dihydralazine agit aussi suivant le

mécanisme de la réaction auto-immunitaire, provoquant la production de anticorps anti-CYP1A2 (Bourdi, 1990).

Afin d'éviter l'inhibition suicide, avec ses graves conséquences, il est important de connaître les sous-structures chimiques le plus souvent responsables de l'inactivation des cytochromes P450. De cette façon, il devient possible de dessiner de nouveaux composés qui ne présentent pas les sous-structures jugées dangereuses, ou de construire de molécules dont ces sous-structures sont masquées par des substituants ce qui évitent l'inactivation des cytochromes. La solution finalement adoptée dépend aussi de l'activité de la molécule modifiée sur la cible thérapeutique : souvent les modifications structurales permettant d'éviter l'inactivation des cytochromes P450 génèrent des molécules d'affinité diminuée pour leur cible ou de spécificité différente.

La connaissance des structures qui conduisent le plus souvent à une inhibition suicide des P450 peut donc éviter de développer des médicaments à risque pour les patients.

2.2. Recherche de littérature

La littérature sur les cytochromes P450 est très étendue et concerne plusieurs aspects différents de leur biologie et biochimie, de la spécificité des substrats à la modélisation moléculaire, au polymorphisme génétique. Des nombreux articles résument les réactions catalytiques (Guengerich, 2001) ou la spécificité des substrats, inducteurs et inhibiteurs (Rendic, 1997) des cytochromes P450.

Les publications qui traitent le problème de l'inhibition suicide sont aussi nombreuses: elles concernent l'utilisation des inhibiteurs suicides comme moyens pour caractériser la structure et le fonctionnement des cytochromes (Kent, 2001), sont focalisées sur les composés naturelles (Zhou, 2004a), sur les médicaments (Zhou, 2004b), sur une seule isoforme comme le CYP2C8 par exemple (Polasek, 2004), ou traitent de la bioactivation des xénobiotiques en général et ne sont pas focalisées sur les cytochromes P450 (Zhou S., 2005).

Chacune de ces revues couvre une partie de la problématique de l'inhibition suicide, mais on n'en a trouvé aucune qui fasse un rapport systématique et complet sur les inhibiteurs suicides.

Partant de l'idée qu'une revue complète pourrait être très utile comme référence rapide et facile à utiliser pour les chimistes cherchant à éviter des groupements chimiques à risque dans de nouvelles molécules, nous avons effectué une recherche de littérature exhaustive et nous avons compilé une base de données. Pour rendre la recherche des sous-structures chimiques plus

facile et rapide (qui est la fonction plus utile pour les pharmaco-chimistes), nous avons organisé les données dans une banque de données chimiques (en format ISIS/Base) d'une part, et d'une autre part en deux tables où les composés sont simplement listés.

Les bases de données existantes sont focalisées soit sur les réactions de métabolisme (par exemple, la MLR – Metabolism Literature Reference), soit sur les substrats et inhibiteurs des cytochromes P450 (Rendic, 1997 ; Rendic, 2000). Dans les deux cas les informations contenues dans les bases de données ne sont que des descriptions qualitatives. Donc, dans la base de données sur les inhibiteurs suicides on a voulu rapporter aussi des données quantitatives (quand connues). C'est pourquoi on a dessiné et programmé une nouvelle banque de données, en utilisant le logiciel ISIS/Base, adapte pour contenir les informations descriptives des inhibiteurs suicides des cytochromes P450 : qualitatives, quantitatives et structures chimiques.

Par rapport aux deux tables des composés, la base de données en format ISIS/Base présente des avantages, liés à la rapidité et à la simplicité de la recherche des données. La recherche dans la base de données peut être effectuée en utilisant des mots clefs présents dans un champ de recherche quel qu'il soit. On peut rechercher toutes les fiches contenant le champ de recherche qui correspond exactement à des mots précis, en écrivant ces mots dans un champ de recherche ; par exemple, si on recherche l'expression « CYP3A4 » dans le champ « Isoforms », on retrouvera toutes les fiches qui contiennent seulement CYP3A4 dans ce champ, mais on ne retrouvera pas les fiches dont le champ « Isoforms » contient CYP3A4 ensemble avec d'autres isoformes (figure 2.1a). Afin de retrouver toutes les fiches qui contiennent une expression dans un certain champ de recherche, soit seule soit ensemble avec d'autres mots, il faut utiliser le critère de recherche suivant, valable pour toutes les bases des données ISIS : *like%EXPRESSION%*. Donc, si on recherche « *like%CYP3A4%* » dans le champ « Isoforms », on retrouvera toutes les fiches de la base de données qui contiennent dans ce champ soit CYP3A4 tout seul, soit ensemble avec des autres isoformes (figure 2.1b). Une autre modalité de recherche est celle par structure chimique : en connaissant la structure d'une molécule, on peut la rechercher dans la banque de données. Mais on peut aussi effectuer une recherche par sous-structures chimiques : il est possible de retrouver toutes les composés de la base de données qui contiennent un groupement chimique particulier (figure 2.1c). Il faut souligner que la recherche n'est pas effectuée par similarité : en recherchant une sous-structure chimique, on retrouvera seulement les composés qui ont dans leur structure le groupement exact qu'on a rentré dans le champ de recherche, mais pas les composés qui ont des groupements chimiques similaires.

La base des données en format ISIS/Base présente comme caractéristiques principales une grande flexibilité et une grande rapidité d'utilisation. Grâce aux nombreuses modalités de recherche différentes, la banque de données peut être facilement utilisés pour des recherches basées soit sur les références de littérature, soit sur les qualités biologiques des composés, soit sur leurs caractéristiques chimiques. C'est un outil très apprécié par les pharmaco-chimistes concernés par le « design » de nouvelles molécules, en particulier pour la possibilité de rechercher les inhibiteurs suicides par sous-structure.

2.3. Présentation de la base de données

La revue présentée ici est un résumé des informations sur les inhibiteurs suicides, trouvées dans la littérature jusqu'à mai 2005. Les données principales décrivant un inhibiteur suicide ont été organisées soit sous forme de deux tables (une pour les inhibiteurs suicides des cytochromes P450 humains et une pour les composés actifs sur les isoformes non humaines), soit sous forme de base de données ISIS/Base.

On a créé ex-novo la banque de données en format ISIS, de façon de pouvoir y mettre tous les domaines et les informations considérés comme importantes pour donner une description compacte et synthétique de chaque inhibiteur suicide.

Les informations contenues dans les deux tables et dans la base de données sont essentiellement les mêmes, mais l'organisation des données est légèrement différente. Dans la banque ISIS/Base les champs de recherche sont plus nombreux que dans les tables, où on a réuni sous le titre « Comments » toutes les détails expérimentaux et les informations sur la modalité de liaison entre le métabolite réactif et le cytochrome P450, et où on a éliminé les détails concernant les systèmes *in vitro* utilisés. En plus, dans les tables les références bibliographiques on indique seulement par leur numéro de référence et leur PMID (PubMed Identification Number).

Les deux tables sont décrites et expliquées en détail dans la publication attachée à la fin de ce chapitre, publiée par la revue Current Drug Metabolism.

Les domaines qui constituent la base de données (figure 2.2) sont les suivants.

Nr	Name	Ki_microM	kinact_min-1
	Structure	Binding Mode	
		Isoforms	Species
		CYP3A4	In vitro system
		Partition Ratio	
Comments			
Reference			

Nr	Name	Ki_microM	kinact_min-1
40	Raloxifene	9.90	0.160
	Structure	Binding Mode	
		Isoforms	Species
		CYP3A4	Human
		In vitro system	Baculavirus expressed P450 in insect microsomes
Comments		Partition Ratio	
Reference			

Testosterone 6-beta hydroxylation was used as specific 3A4 activity.

Chen, Q., J. S. Ngui, et al. (2002). "Cytochrome P450 3A4-mediated bioactivation of raloxifene: irreversible enzyme inhibition and thiol adduct formation." Chemical Research in Toxicology 25(7): 907-14.

Nr	Name	K_i_microM	kinact_min-1
Structure		Binding Mode	
Comments		Isoforms	Species
Reference		Partition Ratio	In vitro system

Nr	Name	K_i_microM	kinact_min-1
25	Glabridin	7.00	0.140
Structure		Binding Mode	
		Isoforms	Species
		Partition Ratio	In vitro system
Comments		Reference	

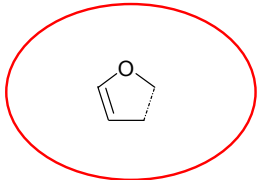
Comments: 7BFC O-debenzylation and 7EFC O-deethylation activities were used as markers for CYP3A4 and CYP2B6 activity respectively.

Isoforms: CYP3A4, CYP2B6

Species: E. Coli recombinant reconstituted P450

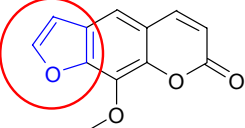
Reference: Kent, U. M., M. Aviram, et al. (2002). "The licorice root derived isoflavan glabridin inhibits the activities of human cytochrome P450s 3A4, 2B6 and 2C9." Drug Metabolism and Disposition 30(6): 709-715

(b)

Nr	Name	KI_microM	kinact_min-1
	Structure 	Binding Mode	
	Comments	Isoforms	Species
		Partition Ratio	In vitro system
Reference			

↓

→

Nr	Name	KI_microM	kinact_min-1
248	Methoxsalen (8-Methoxy-psoralen)	45.30 - 2.00	0.369 - 0.022
Structure 		Binding Mode	
Comments		Isoforms	Species
CYP73A1 is more susceptible to inhibition than CYP73A10 which is more sensitive than CYP73A32.		Partition Ratio	In vitro system
Reference			
Gravot, A., R. Larbat, et al. (2004). "Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant-Ruta graveolens-exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation." Arch Biochem Biophys 422(1): 71-80.			

(c)

Figure 2.1 : Exemples de possibles recherches dans la base de données ISIS/Base des inhibiteurs suicides. (a) Recherche d'une expression spécifique et unique ; (b) recherche d'une expression, soit seule soit dans un contexte ; (c) recherche par substructure chimique.

Name (Nom des composés)

Les composés sont indiqués par leur nom courant, soit les composés pharmaceutiques, soit les extraits des plantes (molécules d'origine naturelle) soit les composés chimiques. Pour les composés qui n'ont pas un nom courant, on indique le nom chimique systématique et éventuellement une abréviation.

Dans chacune des deux tables présentées dans l'article, les composés sont listés selon la structure chimique jugée responsable de l'inhibition suicide des cytochromes P450. Les composés qui ont un furane comme structure métabolisée en intermédiaire réactif sont rapportés d'abord, suivis par ceux qui ont un thiophène comme responsable de l'inhibition suicide, et par ceux dont la sous-structure réactive est un acétylène ou une oléfine terminale, un benzodioxole, une amine ; on continue avec les molécules dont la structure métabolisée en composé réactif est un groupement bien identifié différent de ceux précédemment indiqués, et finalement les molécules dont la structure responsable de l'inactivation n'a pas encore été identifiée.

Structure

La structure chimique de chaque inhibiteur est rapportée dans la base de données. La sous-structure considérée responsable de l'inactivation des cytochromes est mise en évidence par un cercle (dans les tables dans l'article) ou en couleur magenta (dans la base ISIS/database), quand cette sous-structure a été reconnue.

Isoforms (Isoformes)

Pour chaque composé, toutes les isoformes des cytochromes P450 inactivés sont indiquées. La base de données n'est pas limitée aux cytochromes humains, mais on y trouve aussi isoformes animales et végétales. Au total, 31 isoformes différentes sont mentionnées dans la base de données.

Si la spécificité de l'inhibiteur n'a pas été déterminée, ce domaine de la table est laissé vide.

Species (Espèces)

Comme les isoformes des cytochromes considérées dans la base de données ne sont pas nécessairement humaines, les espèces sur lesquelles les composés ont été testés et ont montré une inhibition suicide sont indiquées.

Dans la base de données, il est possible de retrouver les inhibiteurs pour des isoformes des cytochromes appartenants à 12 espèces animales différentes et une végétale.

Ce domaine manque dans la table 1 de la publication où on décrit les inhibiteurs suicides des cytochromes P450 humains, car la seule espèce considérée est l'espèce humaine.

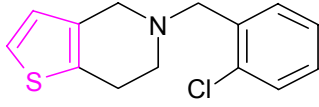
Nr	Name	KI_microM	kinact_min-1
48	Ticlopidine	87.00	0.032
Structure 		Binding Mode Covalent binding of ticlopidine S-oxide to an amino acid of the CYP active site	
Comments 5-hydroxylation of 2-arylthiophenes was used as a marker for CYP2C activity.		Isoforms CYP2C19	Species Human
		Partition Ratio 26.0	In vitro system Yeast or baculovirus expressed human P450
Reference Ha-Duong, N. T., S. Dijols, et al. (2001). "Ticlopidine as a selective mechanism-based inhibitor of human cytochrome P450 2C19." <i>Biochemistry</i> 40: 12112-12122			

Figure 2.2: un exemple de fiche de la base de données en format ISIS/Base. Toutes les données citées dans chaque fiche de la base sont provenant de la publication rapportée.

***In vitro* system (Système *in vitro*)**

Les différents systèmes *in vitro* employés pour effectuer les tests décrits dans les références bibliographiques, sont résumés dans la base de données ISIS. Les systèmes les plus employés sont les microsomes de tissus animaux (par exemple Foroozesh, 1997) ou humains (par exemple von Moltke, 2000) et les enzymes recombinants. Mais on a trouvé plusieurs solutions expérimentales différentes; des exemples sont: les microsomes de foie d'animaux précédemment traités avec l'inhibiteur (par exemple Vaccaro, 2003); les cytochromes P450 purifiés et reconstitués (par exemple Kent, 2002); les hépatocytes (par exemple Luo, 2003) ou

les cultures cellulaires d'autres tissus (par exemple Defaye, 1996) ; les expériences conduites *in vivo* sur les animaux (par exemple Palovaara, 2000).

Ces informations ne sont pas incluses dans les tables de la publication.

Binding Mode (Mode de liaison)

Le mode de liaison des métabolites réactifs au cytochrome responsable de leur production est décrit dans la base de données. Si la publication ne l'a pas décrite, cette information n'est pas présente.

Les informations concernant le mode de liaison sont indiquées ensemble avec les « Commentaires » des tables de la revue.

Comments (Commentaires)

Les commentaires indiqués concernent des détails expérimentaux supplémentaires pour aider à mieux comprendre le processus d'inactivation, ou ils complètent les données rapportées pour chaque molécule.

K_I , k_{inact} et partition ratio

Ces trois paramètres sont les descripteurs quantitatifs de la réaction d'inactivation des cytochromes P450; ils indiquent l'efficacité des composés comme inhibiteurs suicides.

K_I et k_{inact} sont les paramètres cinétiques qui décrivent la réaction d'inactivation: K_I (μM) indique la concentration d'inhibiteur nécessaire pour inactiver la moitié de l'enzyme; k_{inact} (min^{-1}) représente la vitesse maximale que la réaction d'inhibition peut atteindre. Le « partition ratio » est le rapport entre le nombre de molécules d'inactivateur métabolisées et relâchées par l'enzyme pendant son inactivation.

Reference (Référence)

La publication d'où proviennent les informations rapportées pour chaque molécule est indiquée ; chaque référence comprend les deux premiers auteurs, le titre de l'article, le journal, le volume, les pages et l'année de publication.

Dans les tables de la revue, on indique chaque composé une seule fois, avec toutes les publications qui parlent de ce composé (et ils sont indiqués par leur numéro de référence et leur PMID). Dans la base de données ISIS/Base, chaque entrée est unique pour un seul composé et

une seule publication qui parle de ce composé. Dans la banque chaque entrée est unique alors que dans les tables il peut y avoir plusieurs références pour une même molécule.

2.4. Discussion

Le nombre total des composés contenu dans la base de données est de 194 molécules différentes. La distribution de la spécificité de ces composés pour les isoformes différentes de cytochromes P450 est plutôt intéressante : 47 molécules sont des inhibiteurs spécifiques pour le CYP3A4, 24 pour les CYP1A1/2, 7 composés sont spécifiques pour le CYP2D6 et seulement 5 pour les CYP2C8/9/19. La plupart des composés (68 au total) ne sont pas spécifiques d'une isoforme particulière, mais ils sont capables d'attaquer et d'inactiver plusieurs isoformes de cytochromes P450 : par contre, 43 composés ont montré une spécificité pour d'autres isoformes, moins connues ou moins importantes pour le métabolisme des xénobiotiques chez l'homme.

Le fait que les inhibiteurs spécifiques du CYP3A4 soient les plus nombreux, est une conséquence de la structure et des dimensions du site actif de ce cytochrome. Le site actif du CYP3A4 est très vaste et il peut loger deux ou trois molécules au même temps; donc, les composés qui ont des structures très volumineuses peuvent rentrer dans la cavité et être métabolisés par cette isoforme (Yano, 2004). Par conséquent, parmi les inhibiteurs suicides, il y a une grande variété des composés qui réussissent à rentrer dans le site actif du CYP3A4 pour être transformés en métabolites réactifs et inactiver l'enzyme même. Par contre, la cavité du CYP2C9 est plus étroite et plus difficile d'accès pour des molécules encombrantes, et la variété des structures des substrats ou des inhibiteurs (réversibles et suicides) de cet enzyme est plus limitée (Melet, 2003).

Les structures les plus fréquemment citées dans la base de données sont présentées en figure 2.3. Ce sont les structures le plus souvent considérées comme responsables de l'inactivation suicide des cytochromes P450.

La métabolisation des inhibiteurs suicides en intermédiaires réactifs a lieu souvent sur ces sous-structures. La partie restante de la structure des molécules peut être responsable de la spécificité ou de l'affinité des composés pour les différents isoformes de cytochromes P450.

Furanes, thiophènes et oléfines terminales sont oxydés par les cytochromes P450 qui produisent des époxydes, des métabolites extrêmement réactifs qui sont très facilement ouverts par des atomes nucléophiles. Ces nucléophiles (azotes) peuvent appartenir aux chaînes latérales des acides aminés du cytochrome P450, ou au cycle de la porphyrine. Dans le deux cas, le résultat

est la formation d'une liaison covalente entre le métabolite réactif et le cytochrome P450, qui est par conséquent inactivé (Wirth, 1976; Parmar, 1993).

Les acétylènes terminaux sont métabolisés par les cytochromes P450 en un intermédiaire cétène, qui est transformé en acide carboxylique par addition d'une molécule d'eau (Ortiz de Montellano, 1991).

Furanes et méthylfuranes isolés sont très facilement oxydés par les cytochromes P450 et le métabolite réactif est un époxyde de furane, ou une structure ouverte éne-dial dérivée du cycle à cinq atomes (Ravindranath, 1984). Les thiophènes peuvent subir l'oxydation en époxyde de thiophène (Dansette, 2005), mais l'oxydation de l'atome de soufre a été aussi démontrée (Valadon, 1996 ; Dansette, 1992).

Dichloro- et trichloro- éthylènes sont aussi oxydés pour former un époxyde comme métabolite réactif. L'époxyde est facilement ouvert par les atomes (azotes) nucléophiliques des aminoacides du site actif de l'enzyme (Lilly, 1998).

Les benzodioxoles (méthylenedioxyphényles) causent l'inactivation des cytochromes P450 à travers la formation d'un intermédiaire de réaction très réactif, un carbène. Le group $-CH_2-$ qui se trouve entre des deux atomes d'oxygène est très activé (pauvre en électron) et donc facilement attaqué par le cytochrome P450. Le carbène est capable de former une liaison de coordination très stable avec l'atome de fer (Fe(II)) de la porphyrine du cytochrome P450, une liaison qui, de fait, est quasi-irréversible (Delaforge, 1985).

Les amines secondaires et tertiaires deviennent métabolites réactifs après leur déalkylation suivie d'une oxydation par le cytochrome P450. Les métabolites réactifs résultants sont, dans ce cas, des hydroxylamines, ensuite oxydées en dérivés nitroso qui forment des complexes de coordination très stables avec le fer (Fe(II)) de l'hème du cytochrome P450 (Pessayre, 1981 ; Delaforge, 1983). Les amines secondaires sont des sous-structures très fréquemment présentes dans les médicaments et dans les substances naturelles, mais leurs efficacités et spécificités pour les isoformes des cytochromes P450 sont extrêmement variables, et elles dépendent de la structure complète de la molécule. En fait, nombreux sont les composés qui contiennent une amine secondaire mais qui n'ont aucune activité ni comme inhibiteurs réversibles ni comme inhibiteurs suicides.

Le mécanisme d'inactivation des cytochromes P450 par les dérivés soufrés n'est pas encore été complètement explicité. Les diverses auteurs présentent différentes hypothèses sur les possibles liaisons qui se forment entre métabolites réactifs et cytochromes P450: alkylation de l'hème, alkylation de la protéine, liaison entre hème modifié et chaîne protéique. Par exemple, a été

montré que dans le métabolisme du méthimazole, il y a libération de soufre atomique (S), qui va s'insérer dans les groupements –SH des protéines microsomaux pour former des groupes hydrodisulfures (R – S – S – H) (Lee, 1978).

En conclusion, l'inhibition irréversible est une cause de graves interactions médicamenteuses et de réactions nocives pour les patients. C'est donc une caractéristique que les pharmaco-chimistes essaient d'éviter dans le « design » des nouveaux composés thérapeutiques. Cette base de données qui résume la littérature sur les inhibiteurs suicides avec les structures plus fréquentes, s'est avéré un outil très utile pour les pharmaco-chimistes concernés par la conception de nouvelles molécules médicamenteuses.

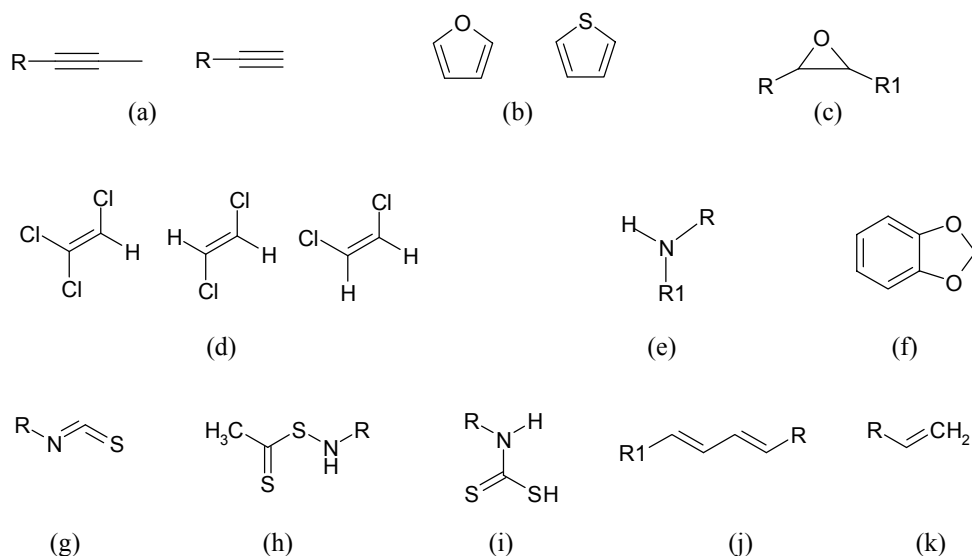


Figure 2.3 : Sous-structures les plus communes capables de causer une inhibition suicide des cytochromes P450. (a) triples liaisons terminales (ω) et $\omega-1$; (b) furanes et thiophènes ; (c) époxydes ; (d) dichloro- et trichloro- éthylènes ; amines secondaires ; benzodioxoles ; isothiocyanates ; (h) thioamides ; (i) dithiocarbamates ; (j) doubles liaisons conjuguées ; doubles liaisons terminales.

2.5 Publication

Cette revue de littérature a été publiée dans Current Drug Metabolism.(2005, Vol 6, Number 5 p 413-454).

L'article est joint ci-dessous.

Cytochrome P450 Enzymes Mechanism Based Inhibitors: Common Sub-Structures and Reactivity

E. Fontana¹, P.M. Dansette^{2,#} and S.M. Poli^{3,*}

¹F. Hoffmann-La Roche Ltd., Pharmaceutical Research, Discovery DMPK, CH-4070 Basel, Switzerland; ²Université René Descartes, CNRS UMR 8601, 75270 Paris Cedex 06, France and ³Addex Pharmaceuticals SA, ADME/PK Department, CH-1228 Plan les Ouates GE, Switzerland

Abstract: The inhibition of human cytochrome P450s (CYPs) is one of the most common mechanisms which can lead to drug-drug interactions. The inhibition of CYPs can be reversible (competitive or non-competitive) or irreversible. Irreversible inhibition usually derives from activation of a drug by CYPs into a reactive metabolite, which tightly binds to the enzyme active site, leading to a long lasting inactivation. This process is called “mechanism based inhibition” or “suicide inhibition”.

The irreversible inactivation usually implies the formation of a covalent bond between the metabolite and the enzyme, which can lead to haptene formation and can in some cases trigger an autoimmune-response.

For these reasons it is of utmost importance to study the mechanism of the CYP inhibition of new potential drugs as early as possible during the drug discovery process.

The literature on CYPs is vast and covers numerous aspects of their biology and biochemistry, however to our knowledge there is no general and systematic review focusing on mechanism-based inhibitors; we have reviewed the literature and compiled all the available data on chemical entities, which are known to be CYP suicide inhibitors. Each compound is reported together with its chemical structure, the CYP isoform and the parameters describing the inactivation. Literature references are reported together with their PMID (PubMed ID number) to allow a fast retrieval of the papers.

This review offers a quick reference to help predict liabilities of new chemical entities without carrying out extensive *in vitro* work, and will hopefully help in designing safer drugs.

Key Words: Cytochrome P450, Mechanism-based inhibitors.

INTRODUCTION

Cytochromes P450 (CYPs) are a superfamily of haem containing proteins that catalyze a large number of enzymatic reactions, among which the most common is the substrate oxidation by insertion of one oxygen atom. Although more rare, CYP mediated reduction reactions have great importance in the metabolism of chemicals and drugs as well [1]. Most of the CYP-catalyzed reactions lead to the detoxification of xenobiotics, by forming hydrophilic metabolites which can be readily excreted from the body; however, CYPs can also bioactivate pro-drugs, e.g. losartan [2], or they can produce reactive metabolites that, instead of undergoing the usual detoxification pathway, can act as irreversible CYP inhibitors and cause toxicity. Compounds which are transformed by the CYP into reactive species that, prior to release from the active site, cause CYP inactivation are called “mechanism-based” or “suicide” inhibitors.

Reactive metabolites which are formed within a CYP active site can cause irreversible inhibition through different mechanisms: i) they can react with nucleophilic amino acids

present in the active site, ii) they can react with the porphyrin nitrogen atoms, or iii) they can coordinate to the (Fe(II)) to form a tight bond; in this latter case they form a metabolite-intermediate (MI) complex, rather than a covalent bond [3] (Fig. (1)).

There are many reported examples of clinical idiosyncratic drug reactions thought to be caused by reactive metabolites, rather than by the parent drug itself [4]. Covalently modified cytochromes can raise autoimmune responses leading to acute hepatotoxicity [5], as is the case for halothane [6]. Appropriate *in vitro* tests can identify mechanism-based inhibitors early during drug discovery programs, thus minimizing the risk of developing compounds which can later show adverse drug-drug interactions in patients.

Mechanism-based inhibitors have very specific features, which make them recognizable by *in vitro* tests:

- 1) the inhibition is time-, concentration- and NADPH-dependent;
- 2) addition of glutathione (GSH) or radical scavengers in the incubation mixture, as well as other exogenous nucleophiles, do not prevent CYP inactivation, since the trapping would occur outside the active site;
- 3) the inactivation is irreversible: the enzymatic activity cannot be recovered after dialysis or washing of the proteins;

*Address correspondence to this author at the Addex Pharmaceuticals SA, ADME/PK Department, CH-1228 Plan les Ouates GE, Switzerland; E-mail: Sonia-Maria.Poli@addexpharma.com

#The tables are also available as searchable database format (ISIS/Base) and as an Excel file from P. Dansette; E-mail: Patrick.Dansette@univ-paris.fr

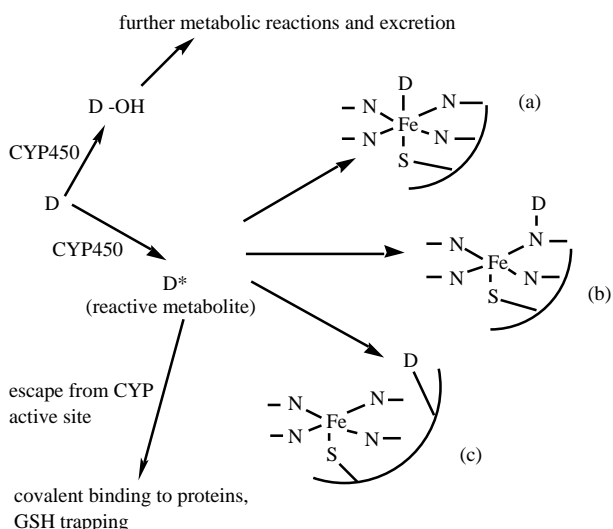


Fig. (1). schematic representation of the possible fates of a xenobiotic: it could be oxidized into a more hydrophilic metabolite and be excreted from the body; it could undergo biotransformation into a reactive metabolite, which could either escape from the CYP active site or cause mechanism-based inhibition, through different binding modes: (a) formation of a MI complex; (b) formation of haeme adducts; (c) binding to amino acids within the enzyme active site.

- 4) the decrease of enzymatic activity with time follows a pseudo-first order kinetics;
- 5) addition of a substrate with good affinity for the CYP can prevent or at least slow down the inactivation;
- 6) P450 content is normally reduced;
- 7) complete inhibition of the enzymatic activity follows a 1:1 stoichiometry [7].

The literature on CYPs is vast and covers multiple aspects of their biology and biochemistry from substrate specificity to molecular modelling and genetic polymorphism. Excellent papers summarizing catalytic activities [1], as well as specific substrates, inducers, and inhibitors [8, 9] have been published. Several papers focus on mechanism-based inhibition, but each of them covers only one or few aspects of this problem, such as the use of mechanism-based inhibitors to characterize structure and activity of CYPs [10], or mechanism-based inhibitors from herbal extracts [11]; they focus on the bioactivation of therapeutic drugs [12], or on drugs that act as mechanism-based inhibitors on one specific isoform of cytochromes P450, such as CYP3A4 [13, 14] and CYP2C8 [15]. To our knowledge, there is no general systematic report focusing on mechanism-based inhibitors. We have reviewed the literature and compiled the relevant data in two easy to read tables, which could serve as a quick reference for medicinal chemists who want to predict liabilities of new chemical entities and design safer drugs. In the tables we report any chemical entity (natural or synthetic) known to cause mechanism-based CYP inhibition.

The compiled tables were also used to derive the recurring structural features and reactions responsible for mechanism based inhibition.

TABULAR REPRESENTATION OF THE CYPs MECHANISM BASED INHIBITORS DATABASE

The most relevant information describing the mechanism-based inhibitors is presented in two different tables. The first table contains the information relative to human CYP mechanism-based inhibitors (Table (1)), the second table contains information regarding CYPs belonging to all other species (Table (2)). In both tables, the compounds are listed in order of substructure believed to cause CYP inactivation, starting with the furans, then thiophenes, acetylenes, terminal alkenes, benzodioxoles, and amines; followed by the compounds which contain substructures that do not enter in the previous categories, to end with those for which the responsible substructure has not been identified. Within each group, compounds are reported in alphabetical order. When a compound inactivates both human and other species CYPs, it is reported in both tables.

The fields composing the tables are the following.

NAME

Drugs, chemicals and natural compounds are cited using their current name. Chemical compounds that do not have a common name, are indicated by their chemical name, and possibly an abbreviation. If a compound is referred to with more than one name, then additional names are reported in the table too.

A total of 206 mechanism-based inhibitors are listed in the tables.

STRUCTURE

Chemical structures of the listed substances are reported in the tables. The substructure considered responsible for mechanism-based inhibition, when known, is circled.

ISOFORMS

All of the CYP isoforms inhibited by each of the mechanism-based inhibitors are listed in the tables. Collected data are not limited to human CYPs (Table (1)), but animal and plant isoforms are listed as well (Table (2)). A total of 31 different isoforms are reported in the tables. When no information is reported in this field, no specificity of inhibition was found in the literature reference.

SPECIES

In Table (1), all the reported compounds are inactivators of human CYPs, therefore this field is not reported. In Table (2), where inhibitors on all the other species are listed, the species on which the compounds show mechanism-based inhibition are reported in this column. 12 different animal and one plant species are listed in the database.

K_i , K_{inact} AND PARTITION RATIO

These three parameters are quantitative descriptors of the inactivation reaction. Their values are related to the efficiency of the compounds as suicide inhibitors. K_i and k_{inact} are the kinetic parameters describing the inactivation process: K_i is the concentration of inhibitor for half-maximal inactivation; k_{inact} represents the maximal inactivation rate

constant. These parameters are correlated through the following relationship:

$$k_{obs} = \frac{k_{inact} \times [I]}{K_I + [I]}$$

where k_{obs} is the observed inactivation rate constant and $[I]$ is the inhibitor concentration.

Partition ratio represents the number of cycles that a CYP is able to perform before being totally inactivated; it is the number of molecules of inhibitor consumed minus one, in order to achieve total inactivation [16].

COMMENTS

Comments on experimental details, which can provide a better insight into the inactivation process, are reported in the table. Reactions used to assess enzyme activity, further information regarding the compounds inactivation potency, or data from *in vivo* experiments, are the most commonly reported comments. In this column, we also describe the mechanism of inactivation or the mode of binding between reactive metabolite and CYP, which are thought to be responsible for irreversible inhibition. When controversial hypotheses regarding the binding mode of specific compounds have been published in different papers, all the different versions are described in the table.

REFERENCE

For each compound, all the related references are listed in the table. The PMID (PubMed ID number) of each paper is reported too, in order to allow free and quick retrieval of the paper abstracts through the Pub Med website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) and eventually the full text article.

DISCUSSION

206 mechanism-based inhibitors are reported in the tables. The distribution of the specificity for the different CYP isoforms is the following: 59 compounds are specific inhibitors for CYP3A4, 24 for CYP1A1/2, 7 compounds are specific inhibitors for CYP2D6 and only 5 for CYP2C8/9/19. The majority of the listed compounds (68 compounds) are not specific for a single cytochrome isoform, but they are able to inactivate different isoenzymes; while 43 compounds are specific for other CYP isoforms, less common or less relevant for drug metabolism. The most frequently occurring substructures are presented in Fig. (2).

Metabolic activation of mechanism-based inhibitors, leading to reactive intermediates able to irreversibly bind to the enzyme, takes place on these substructures. All the rest of the compound structure is often responsible for the affinity of the molecule for the CYP or for the specificity on one isoform.

CHEMISTRY OF COVALENT ADDUCT AND TIGHT-BINDING COMPLEX FORMATION

1) Acetylenes

One of the best-studied classes of mechanism-based CYP inhibitors is the acetylenes. They appear to be oxidized by CYPs to give an intermediate "oxirene", which rearranges to a reactive ketene and reacts to nucleophiles resulting in covalent binding and consequent CYP inactivation. Nucleophiles involved are nitrogen atoms belonging to the porphyrin ring or to the protein.

2) Furans, Thiophenes, Conjugated Structures and Terminal Alkenes

The general mechanism of inactivation appears to be the formation of an epoxide intermediate, which can be qu-

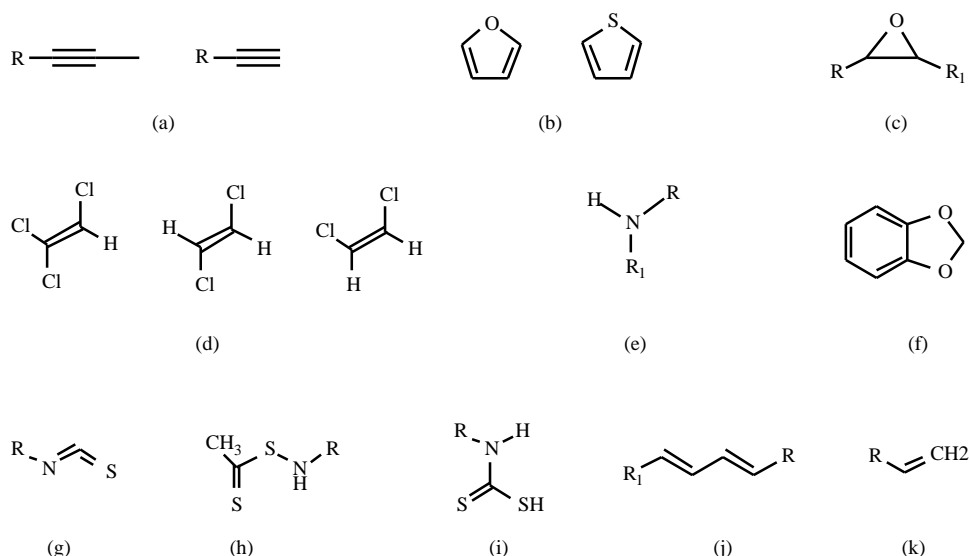


Fig. (2). the most common substructures causing mechanism-based inactivation of cytochromes P450. (a) Terminal () and -1 acetylenes; (b) furans and thiophenes; (c) epoxides; (d) dichloro- and trichloro-ethylenes; (e) secondary amines; (f) benzodioxoles (methylenedioxyphenyl compounds); (g) isothiocyanates; (h) thioamides; (i) dithiocarbamates; (j) conjugated structures; (k) terminal alkenes.

enched by nucleophilic attack by one nitrogen atom belonging to the protein sidechain or to the haem. In both cases the result is the formation of a covalent binding between the reactive metabolite and the CYP, which is consequently inactivated [17, 18] (Fig. (3a)).

Isolated furans and methylfurans are relatively small molecules that can easily enter the CYP active site and approach the haem. The final product of their metabolism can be either a hydroxylated furan or an open bi-carbonylic structure (Fig. (3b)) derived from the five-atom ring [19].

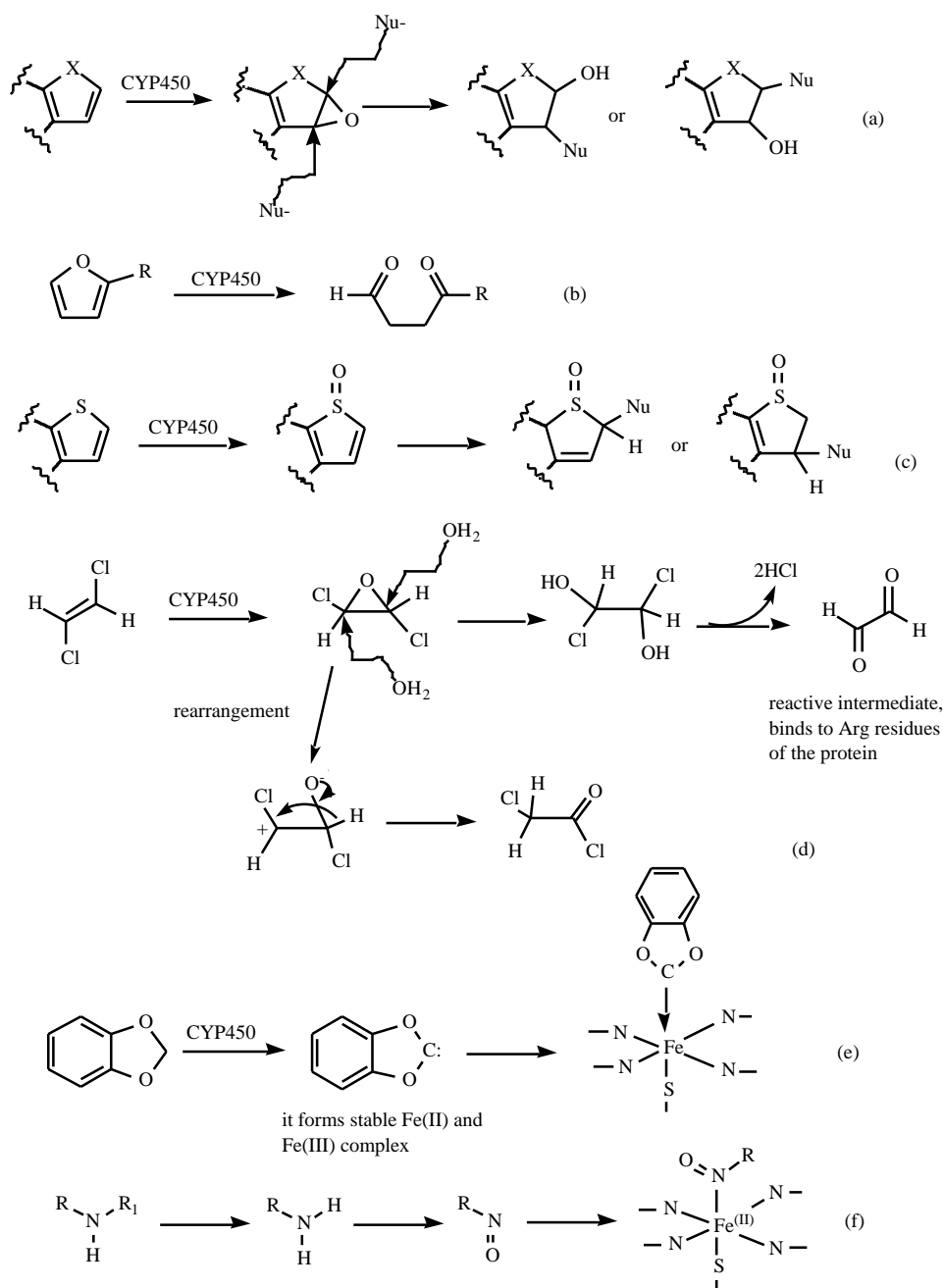
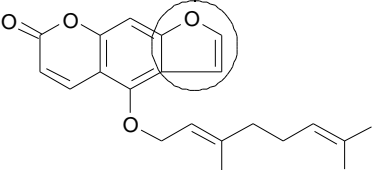
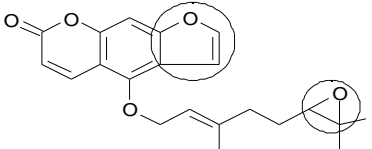
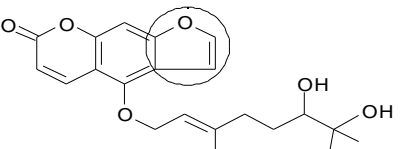
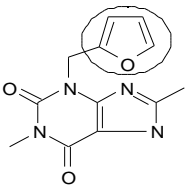
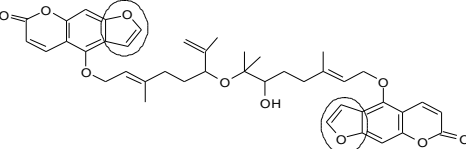
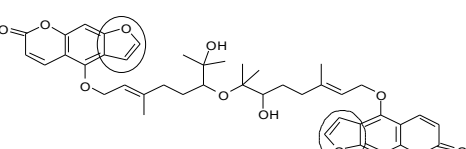
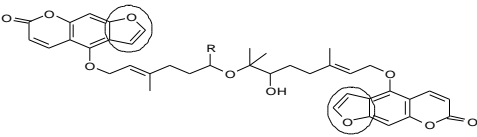
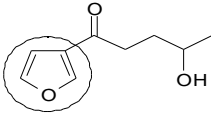
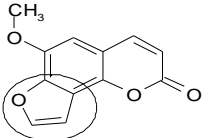
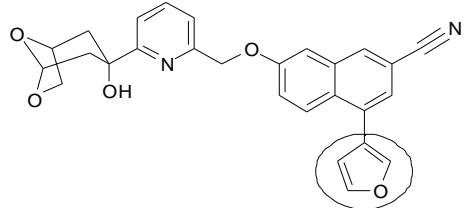
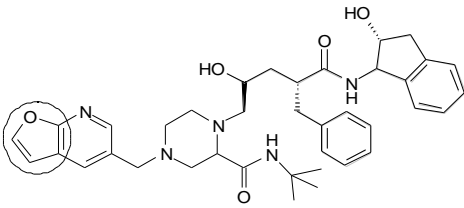
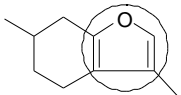


Fig. (3). The most common reactions producing reactive metabolites, able to inactivate cytochromes P450. (a) Furans, thiophenes, double and triple bonds are metabolized into epoxides and oxirenes as reactive intermediates; (b) furans and methylfurans oxidation can produce open derivatives of the five-member ring; (c) thiophenes could also be metabolized into electrophilic S-oxides to which nucleophiles may add; (d) dichloro- and trichloro-ethylenes give an epoxide upon oxidation; (e) benzodioxoles reactive metabolite is a carbene which can strongly coordinate to the iron atom of the CYP; (f) secondary amines are dealkylated and oxidized to N-nitroso-amines, which attack the iron atom of the porphyrin ring.

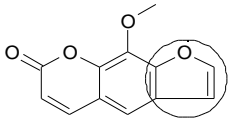
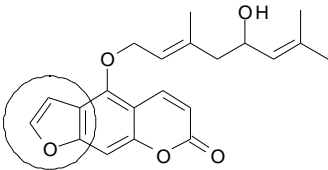
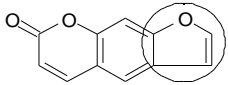
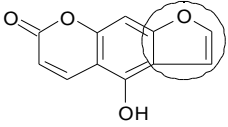
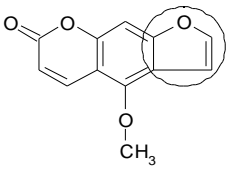
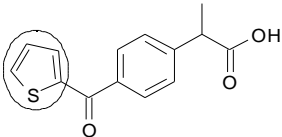
Table 1. Mechanism-Based Inhibitors on Human CYP Isoforms. In the Table the Compounds Names Appear Together with the Chemical Structure, the Isoform on which they showed Inactivation, Quantitative Parameters, Comments and the Literature References

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
1	Bergamottin		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a specific activity for CYP3A4				[23] 10859150
			CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation and erythromycin N-demethylation were used as probe activities of CYP3A4. Covalent binding to apoprotein.	7.7	0.3		[24] 9548795
			CYP3A4		40	0.08		[25] 10860553
			CYP2B6 CYP2B1 CYP2B4 CYP3A5	KI and kinact reported values refer to CYP3A5, 2B6, 2B4, 2B1 respectively. Partition ratio values refer to CYP2B6 and 3A5 respectively.	20- 5.2- 2.8- 2.4	0045- 0.087- 0.068- 0.049	ca. 2 - ca. 20	[26] 15608076
2	(R)-Bergamottin-6',7'-epoxide (GF-I-5)			Testosterone beta-hydroxylation was used as index of microsomal CYP3A activity. Denaturation of the apo-protein, modification of the heme or covalent binding to the active site				[23] 10859150
3	6',7'-Dihydroxy-Bergamottin		CYP3A4		59	0.16		[27] 9351897
			CYP3A4	Nifedipine oxidation, omeprazole 3-hydroxylation and omeprazole sulfoxidation were used as specific CYP3A4 activities	5.56	0.06		[25] 10860553
			CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a specific activity for CYP3A4				[23] 10859150
4	Furafylline		CYP1A2	Formation of 6-hydroxywarfarin was used as a marker of CYP1A2 activity. Formation of a radical and covalent binding to apoprotein	23	0.87		[28] 9585555
			CYP1A2	EROD activity was used as a probe for CYP1A1 and 1A2 activity	3	0.27		[29] 7975717
5	Furanocoumarin dimer (GF-I-4)		CYP3A4	Nifedipine oxidation, omeprazole 3-hydroxylation and omeprazole sulfoxidation were used as specific CYP3A4 activities	0.31	0.05		[25] 10860553
			CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a specific activity for CYP3A4				[23] 10859150
6	Furanocoumarin dimer (GF-I-1)		CYP3A4	Nifedipine oxidation, omeprazole 3-hydroxylation and omeprazole sulfoxidation were used as specific CYP3A4 activities	0.13			[25] 10860553
			CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a specific activity for CYP3A4				[23] 10859150

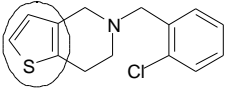
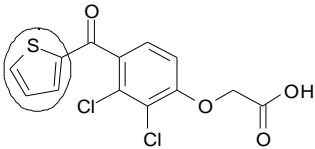
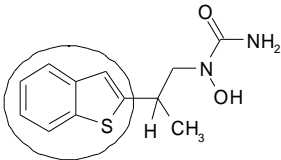
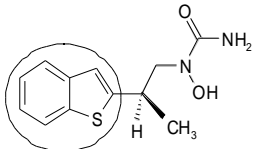
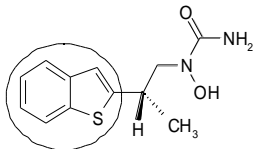

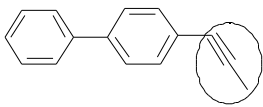
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
7	Furanocoumarin dimers and trimers		CYP3A	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as an index of microsomal CYP3A activity				[30] 10877530
8	4-Ipomeanol		CYP3A4	DBF fluorescence was measured as a probe for CYP3A4 activity. Covalent binding to apoprotein.	20.0	0.15	257	[31] 14967002
9	Isobergapten		CYP3A	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as an index of microsomal CYP3A activity				[30] 10877530
10	L-739,010		CYP3A	Covalent binding to microsomal proteins				[32] 8839061
11	L-754,394		CYP3A	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured to assess CYP3A4 inhibition. Reported K _i , k _{inact} and partition ratio values refer to human CYP3A4. Covalent binding to apoprotein	7.5	1.62	1.4	[33] 8870989
			CYP3A4 CYP2D6	Testosterone 6-beta hydroxylase activity was used as a probe for CYP3A4 activity and reported k _{inact} , K _i and partition ratio values refer to this activity. Bufurazol 1'-hydroxylase was used for CYP2D6 and kinetic parameters are: K _i 32 microM, k _{inact} 0.18. Alkylation of apoprotein.				[34] 8531125
			CYP3A4	Covalent modification of the apoprotein				[35] 10757976
12	Menthofuran		Non specified					[36] 10220485
			CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylase activity was measured to assess CYP2A6 activity; reported k _{inact} , K _i and partition ratio refer to purified P450, for HL microsomes they are respectively: 0.22 min ⁻¹ , 2.5 microM. Covalent binding to apoprotein.	0.84	0.25	2.9-4.1	[37] 9660853

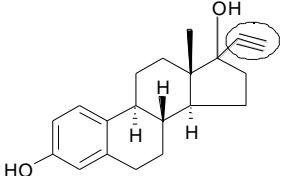
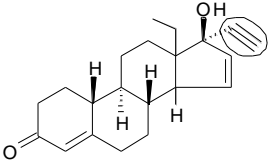
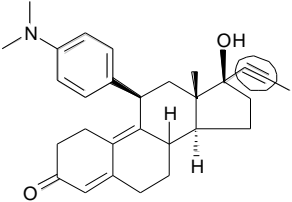
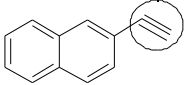
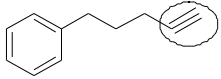
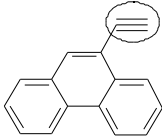
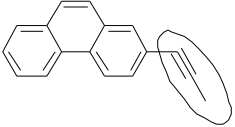
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
13	Methoxsalen (8-Methoxy-psoralen)		CYP2A6	The formation of 7-hydroxycoumarin was measured to determine CYP2A6 activity. Reported K _i and k _{inact} refer to the recombinant system, liver microsomes gave K _i 1.9 μM and k _{inact} 2.1 min ⁻¹	0.8	1.00	21	[38] 9394031
			CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylase activity was measured as a probe of CYP2A6 activity; reported partition ratio refers to lymphoblastoid cells expressed P450, for baculovirus infected insect cells expressed P450 it is 23.9. Covalent binding to apoprotein	1.9	2.00	11.2	[39] 9665710
			CYP2A13	Coumarin 7-hydroxylation and testosterone 15-hydroxylation were measured as probes for CYP2A13 activity. Covalent binding to apoprotein.				[40] 15579482
14	Notopterol		CYP3A	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as an index of microsomal CYP3A activity				[30] 10877530
15	Psoralen		CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylase activity was measured as a probe of CYP2A6 activity; reported partition ratio refers to lymphoblastoid cells expressed P450, for baculovirus infected insect cells expressed P450 it is 71.2	0.60	0.30	46	[39] 9665710
16	5-Hydroxy-psoralen		CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylase activity was measured as a probe of CYP2A6 activity. Covalent binding to apoprotein	11.60	0.02		[39] 9665710
17	5-Methoxy-psoralen		CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylase activity was measured as a probe of CYP2A6 activity; reported partition ratio refers to lymphoblastoid cells expressed P450, for baculovirus infected insect cells expressed P450 it is 57.4. Covalent binding to apoprotein	12.0	0.36		[39] 9665710
18	(+/-) Suprofen		CYP2C9		3.7	0.091	101	[41] 14570769

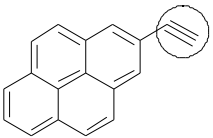
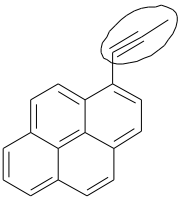
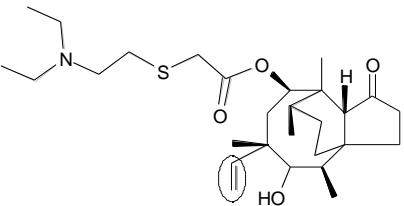
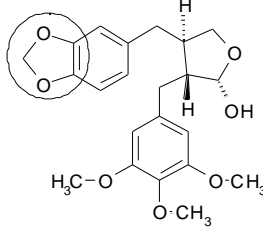
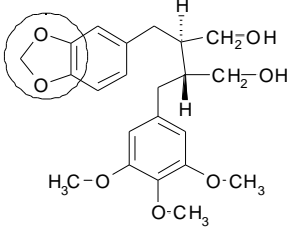
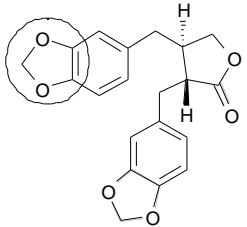
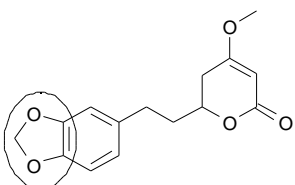
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μ M)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
19	Ticlopidine		CYP2B6	Bupropion hydroxylation was measured as a test activity for CYP2B6. Reported K _i and k _{inact} were measured on human liver microsomes, on recombinant CYP2B6 they are: 0.8 μ M and 0.8 min ⁻¹ respectively	0.2	0.50		[42] 14563790
			CYP2C19	5-hydroxylation of 2-arylthiophenes was used as a maker for CYP2C activity. Covalent binding of ticlopidine-S oxide to an aminoacid in the CYP active site	87.0	0.032	26	[43] 11580286
20	Tienilic acid		CYP2C9	Tienilic acid 5-hydroxylation was used as a probe of cytochromal activity.				[44] 8944768
			CYP2C9 CYP2C10	Covalent binding to the apoprotein	4.3	0.22	11.6	[45] 8286335
21	Zileuton (Racemate)		CYP1A2	Phenacetin O-deethylation (POD) activity was used as specific marker of CYP1A2 activity	117	0.035		[46] 14570767
22	(R)-(+)-Zileuton		CYP1A2	Phenacetin O-deethylation (POD) activity was used as specific marker of CYP1A2 activity	66.00	0.012		[46] 14570767
23	(S)-(-)-Zileuton		CYP1A2	Phenacetin O-deethylation (POD) activity was used as specific marker of CYP1A2 activity	98.20	0.037		[46] 14570767
24	Acetylene		CYP1A2	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as enzyme essay. Formation of a radical-cation and binding of this species to the heme moiety				[47] 9760279
25	4-propynyl biphenyl		CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as enzyme essay. Formation of a radical-cation and binding of this species to the heme moiety				[47] 9760279
			CYP1A1 CYP1A2	Reported K _i and k _{inact} refer to CYP1A1 (EROD activity); for CYP1A2 (MROD activity) they are: 0.013 μ M and 0.1 min ⁻¹ respectively. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.22	0.4		[48] 9074808

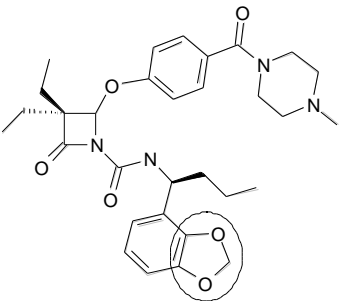
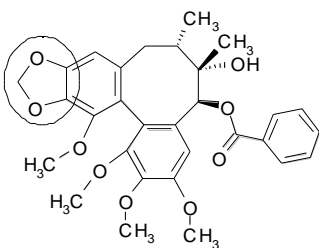
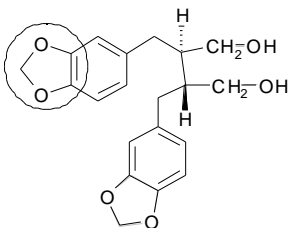
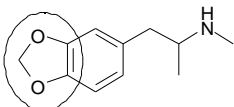
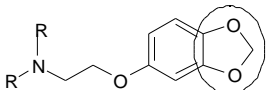
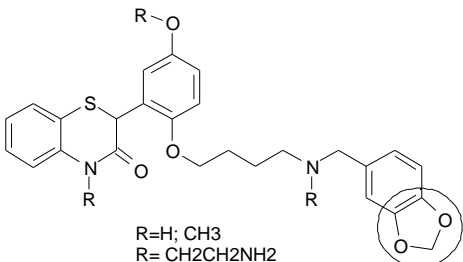
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
26	17-alpha-Ethynyl estradiol		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a probe for CYP3A4 activity. Covalent modification of the apoprotein and of the heme	18.00	0.04	50	[49] 11907170
			CYP3A4	Midazolam hydroxylation was used as a marker for CYP3A4 activity - <i>In vivo</i> studies				[50] 11012556
			CYP2B6	7-EFC O-deethylation activity was tested to assess CYP2B6 activity. Alkylation of the apoprotein	0.90	0.02		[51]
			CYP2B1 CYP2B6	Reported kinact, KI and partition ratio values refer to CYP2B6 (human) and to CYP2B1 (rat) respectively. 7-EFC O-deethylation was used as a marker for CYPs activity. Binding to the apoprotein	0.80- 11.00	0.030- 0.200	13.0- 21.0	[52] 1185216
27	Gestodene		CYP3A4	Midazolam hydroxylation was used as a marker for CYP3A4 activity. <i>In vivo</i> studies				[50] 11012556
			CYP3A4					[53] 9385444
			CYP3A4	Porphyrin N-alkylation or modification of amino acid residues or covalent heme-apoprotein cross-links				[54] 2133086
28	Mifepristone		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured as a probe for CYP3A4 activity. Heme destruction	4.7	0.089		[55] 9918590
29	2-ethynyl naphtalene		CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as enzyme assay. Formation of a radical-cation and binding of this species to the heme moiety				[47] 9760279
30	5-phenyl pentyne		CYP2B1	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as enzyme assay. Formation of a radical-cation and binding of this species to the heme moiety				[47] 9760279
31	9-ethynyl phenanthrene		CYP2B	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as enzyme assay. Formation of a radical-cation and binding of this species to the heme moiety				[47] 9760279
32	2-propynyl phenanthrene		CYP1A1 CYP1A2	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as enzyme assay. Formation of a radical-cation and binding of this species to the heme moiety				[47] 9760279

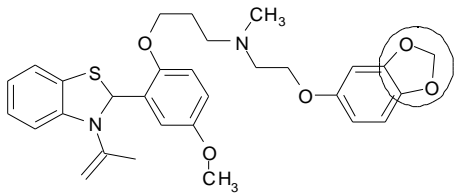
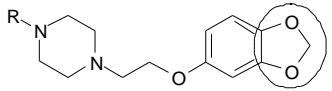
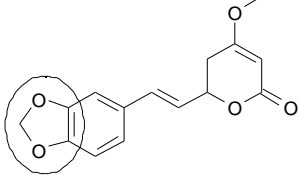
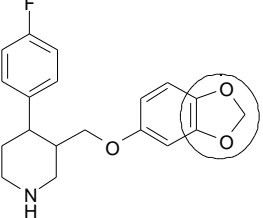
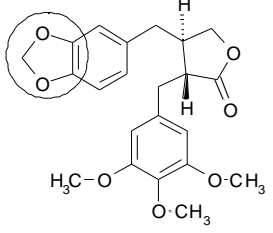
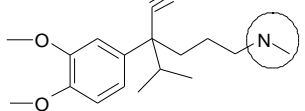
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
33	2-ethynyl pyrene		CYP1A1 CYP1B1	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as enzyme assay. Formation of a radical-cation and binding of this species to the heme moiety				[47] 9760279
34	1-propynyl pyrene		CYP1A1 CYP1A2	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as enzyme assay. Formation of a radical-cation and binding of this species to the heme moiety		0.6		[47] 9760279
35	Tiamulin		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylase activity was measured to assess CYP3A4 activity. Covalent binding to microsomal proteins				[56] 7575636
36	(-)-Cluslin		CYP3A4	(14C)formaldehyde production from (N-methyl -14C)-erythromycin was used as a probe activity for CYP3A4	0.082	0.253		[57] 15748631
37	(-)-Dihydrocluslin		CYP3A4	(14C)formaldehyde production from (N-methyl -14C)-erythromycin was used as a probe activity for CYP3A4	0.054	0.310		[57] 15748631
38	(-)-Dihydrocubebin		CYP3A4	(14C)formaldehyde production from (N-methyl -14C)-erythromycin was used as a probe activity for CYP3A4	0.142	0.225		[57] 15748631
39	Dihydromethysticin		Not specified	Human liver microsomes were incubated with NADPH and dihydromethysticin and UV spectra recorded. MI complex formation				[58] 12386118

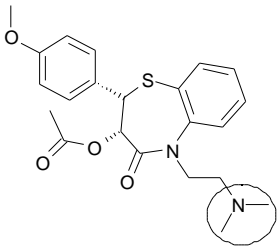
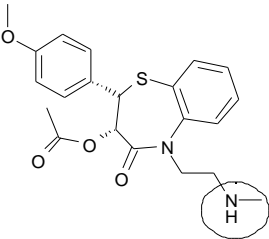
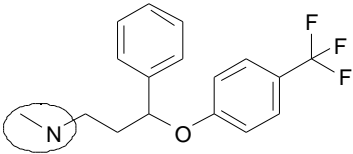
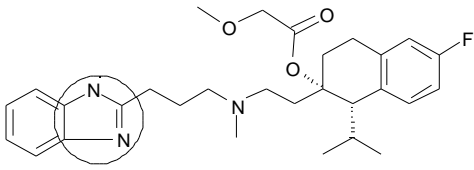
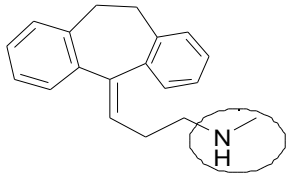
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
40	DMP777		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured to assess CYP3A4 residual activity. MI complex formation				[59]
41	Gomisin C		CYP3A4	N-demethylation of erythromycin was used as a marker of CYP3A4 activity. Gomisin C is found in Schisandra fruit extracts. MI complex formation	0.399	0.092		[60] 15342469
42	(-)-Hinokinin		CYP3A4	(14C)formaldehyde production from (N-methyl -14C)-erythromycin was used as a probe activity for CYP3A4	0.373	0.315		[57] 15748631
43	Methylenedioxy methamphetamine (MDMA)		CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylation was used as a marker reaction for CYP2D6 activity. The first of the two reported KI and kinact values refer to tests made with recombinant CYP2D6, the second value refer to tests made with HLM. MI complex formation	12.9- 22.8	0.29- 0.17		[61] 15328252
44	Methylenedioxyphenyl-alkylamines		CYP2D6	KI and kinact depend on the nature of the R substituents on the molecule scaffold. CYP produces a carbene metabolite responsible of the covalent binding	2- 19.8	0.194- 0.253		[62] 10647906
45	Methylenedioxyphenyl-benzothiazines	 R=H; CH ₃ R= CH ₂ CH ₂ NH ₂	CYP3A4 CYP1A1 CYP2C9 CYP2D6	Isoform specificity and KI and kinact depend on the nature of the R substituents on the molecule scaffold. CYP produces a carbene metabolite responsible of the covalent binding				[62] 10647906

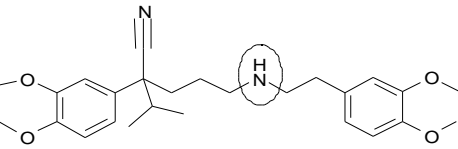
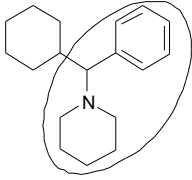
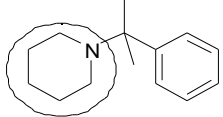
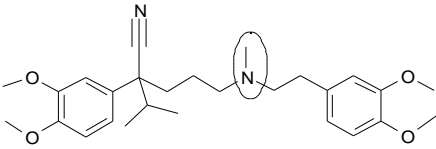
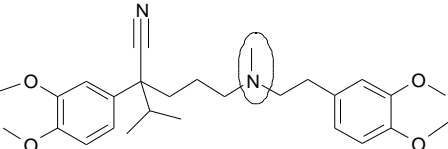
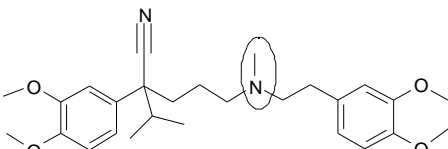
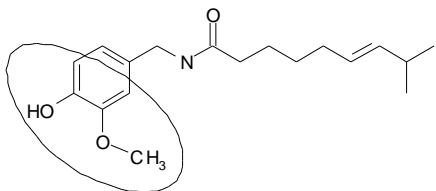
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
46	Methylenedioxyphenyl-benzothiazoline		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured as a probe for CYP3A4 activity. CYP produces a carbene metabolite responsible of the covalent binding	0.25	0.113		[62] 10647906
47	Methylenedioxyphenyl-piperazines		CYP3A4 CYP2D6	Isoform specificity and KI and kinact depend on the nature of the R substituent on the molecule scaffold. CYP produces a carbene metabolite responsible of the covalent binding				[62] 10647906
48	Methysticin		Not specified	Human liver microsomes were incubated with NADPH and methysticin and UV spectra recorded. MI complex formation				[58] 12386118
49	Paroxetine		CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylase was used as specific CYP2D6 activity marker. MI complex formation, after very strong coordination to the heme moiety	4.85	0.17		[63] 12584155
50	(-)-Yatein		CYP3A4	(14C)formaldehyde production from (N-methyl -14C)-erythromycin was used as a probe activity for CYP3A4	0.177	0.320		[57] 15748631
51	D617 (Verapamil metabolite)		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a test for CYP3A4 activity. MI complex formation	7.93	0.07		[64] 14744949

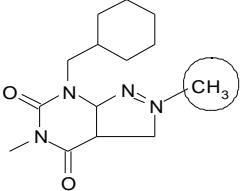
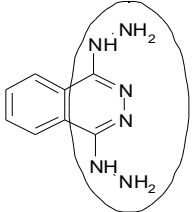
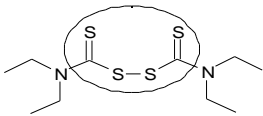
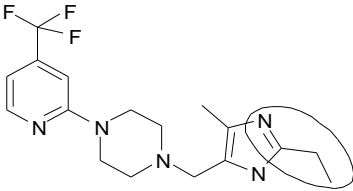
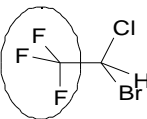
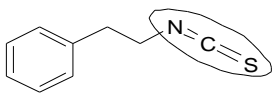
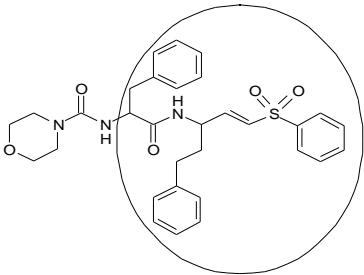
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
52	Diltiazem		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured to monitor CYP3A activity. MI complex formation	0.5	0.01		[65] 10640508
			CYP3A4	Midazolam hydroxylase activity was measured as a probe of CYP3A4 activity. MI complex formation				[21] 10950845
			CYP3A4	Midazolam hydroxylation was measured to assess CYP3A4 activity. Partition ratio values depend on diltiazem concentration in the incubation mixture. MI complex formation	2.2	0.17	13-86	[66] 10454485
			CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylase assay was used as probe for CYP3A4 activity	1.80-4.80	0.060-0.080		[67] 11422004
53	N-desmethyl-diltiazem		CYP3A4	Midazolam hydroxylation was measured to assess CYP3A4 activity. MI complex formation				[66] 10454485
54	Fluoxetine		CYP2C8	Paclitaxel hydroxylation was used as a marker for CYP2C8 activity. KI and kinact measured in recombinant systems, no time dependent inhibition observed in HLM. MI complex formation	294	0.083		[14] 15304522
			CYP3A4	Midazolam hydroxylase activity was measured as a probe of CYP3A4 activity. MI complex formation				[21] 10950845
55	Mibefradil		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation and midazolam 1'-hydroxylation were measured to assess CYP3A4 activity. Irreversible binding				[65] 10640508
			CYP3A4 CYP3A5	Testosterone 6-beta hydroxylase activity was used as a marker for CYP3A4 activity	2.3	0.4	1.7	[68] 10215754
56	Nortriptyline		CYP2C8	Paclitaxel hydroxylation was used as a marker for CYP2C8 activity. KI and kinact measured in recombinant systems, no time dependent inhibition observed in HLM. MI complex formation	49.9	0.036		[14] 15304522

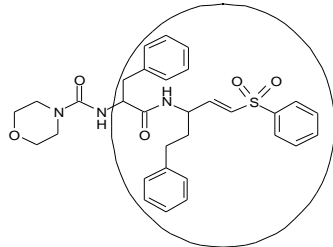
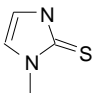
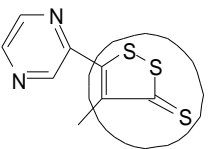
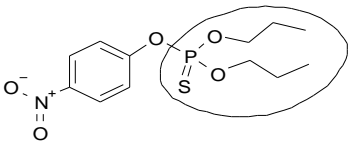
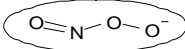
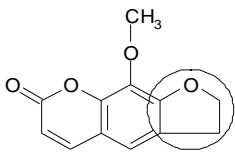
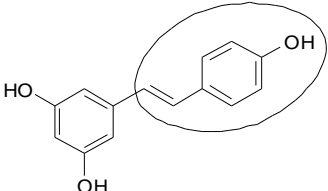
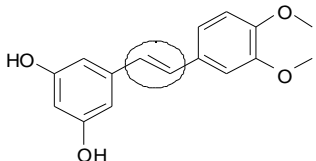
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μ M)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
57	R,S-Norverapamil		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a test for CYP3A4 activity. The lowest reported KI and kinact values refer to HLM, the highest to recombinant CYP incubations. MI complex formation	2.11-5.89	0.21-1.12		[64] 14744949
			CYP3A4 CYP3A5	MI complex formation demonstrated only for CYP3A4.	10.3-4.53	0.30-0.07		[69] 15689501
58	Phencyclidine		CYP2B6	CYP1A2, 2A6, 2C19 and 3A4 activities were evaluated using respectively the following specific substrates: phenacetin, coumarin, tolbutamide, S-mephenytoin	10	0.01		[70] 12485952
59	2-phenyl-2-(1-piperidiny) propane (PPP)		CYP2B1 CYP2B6 CYP2C9	Alkylation of apoprotein. Reported KI, kinact and Partition Ratio refer to CYP2B6 and 2B1, no data are available for CYP2C9	1.20-12.0	0.07-0.3	15-31	[71] 10901699
60	Verapamil		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylase assay was used as probe for CYP3A4 activity. MI complex formation	2.30-3.50	0.110-0.190		[67] 11422004
			CYP2C8	Paclitaxel hydroxylation was used as a marker for CYP2C8 activity. KI and kinact measured in recombinant systems, no time dependent inhibition observed in HLM. MI complex formation	17.5	0.065		[14] 15304522
61	Verapamil (R)		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a test for CYP3A4 activity. The lowest reported KI and kinact values refer to HLM, the highest to recombinant CYP incubations. MI complex formation	5.10-6.46	0.080-0.390		[64] 14744949
62	Verapamil (S)		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a test for CYP3A4 activity. The lowest reported KI and kinact values refer to HLM, the highest to recombinant CYP incubations. MI complex formation	1.39-2.97	0.130-0.640		[64] 14744949
63	Capsaicin		CYP2E1	Covalent binding to the apoprotein				[72] 7746093

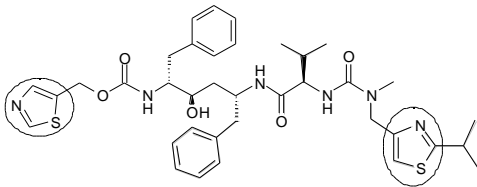
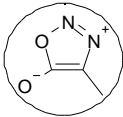
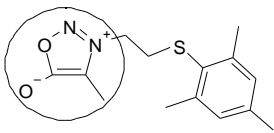
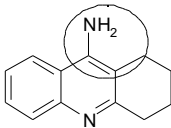
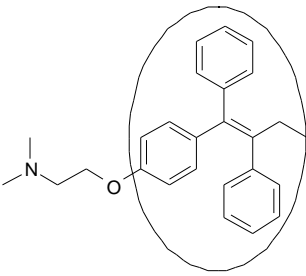
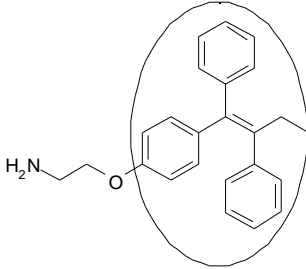
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K_i (μM)	k_{inact} (min^{-1})	Partition Ratio	Ref. (PMID)
64	Cyclohexylline		CYP1A2	Covalent binding to apoprotein		0.89		[28] 9585555
65	Dihydralazine		CYP1A2 CYP3A4	Reported k_{inact} refer to CYP1A2 (phenacetin O-deethylase activity); for CYP3A4 (testosterone 6-beta hydroxylase activity) $k_{\text{inact}}=0.0471 \pm 0.0006 \text{ min}^{-1}$. Covalent binding to apoprotein		0.0169- 0.0215		[73] 10525281
66	Disulfiram		CYP2E1					[74] 1664256
			CYP2E1					[75] 9695717
			CYP2E1					[76] 10805064
67	EMTPP		CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylase activity was used as a probe for CYP2D6 activity. Covalent binding to apoprotein	5.5	0.09	99	[77] 14967005
68	Halothane		CYP2E1	Trifluoroacetylation of the apoprotein. <i>In vivo</i> data				[6] 8902272
69	Phenethyl isothiocyanate (PEITC)		CYP2E1	Chlorzoxazone 6-hydroxylase activity was measured as a probe for CYP2E1 activity	9.98	0.339		[78] 11454729
70	K11002		CYP3A4	Lovastatin 6'-beta hydroxylase activity was used as a marker for CYP3A4 activity				[78] 11038163

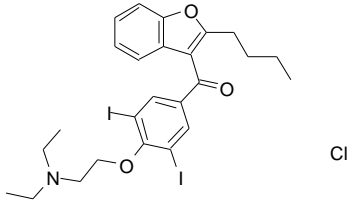
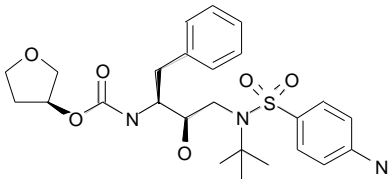
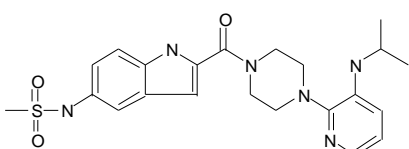
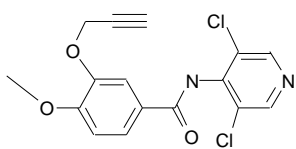
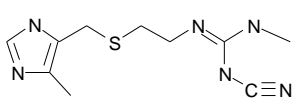
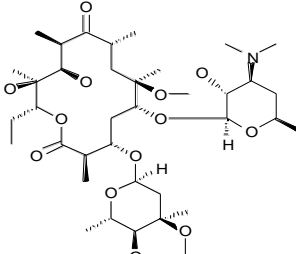
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
71	K11777		CYP3A4	Lovastatin 6'-beta hydroxylase activity was used as a marker for CYP3A4 activity				[79] 11038163
72	Methimazole		CYP3A4 CYP2C9 CYP2C19 CYP2B6					[80] 9172960
73	Oltipraz		CYP1A2	7-Ethoxyresorufin O-deethylation was used as specific CYP1A2 activity marker. Inhibition causes loss of spectral P450 content but no covalent binding of reactive metabolites has been demonstrated	9	0.19		[81] 10775323
74	Parathion		CYP3A4 CYP1A2 CYP2C9	Testosterone 6-beta hydroxylation, 7-Ethylresorufin O-deethylation and Tolbutamide methyl hydroxylation were measured as marker activities for CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9 respectively				[82] 9023313
75	Peroxynitrite		CYP2B1	Nitration of Tyr190 residue of the CYP				[83] 12588183
76	Dihydro-8-methoxy-psoralen		CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylase activity was measured as a probe of CYP2A6 activity; reported partition ratio refers to lymphoblastoid cells expressed P450, for baculovirus infected insect cells expressed P450 it is 840. Covalent binding to protein	27.0	0.14		[39] 9665710
77	trans-Resveratrol		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylase activity was measured as a probe for CYP3A activity				[84] 11701226
			CYP1A1	EROD activity was measured as a probe for CYP1A1 activity				[85] 11259321
			CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a specific CYP3A4 activity. Epoxidation might occur at the ethylene bridge of resveratrol	20	0.20		[86] 11125847
78	Rhapontigenin		CYP1A1	EROD activity was determined for the measurement of CYP1A1 activity. Binding of reactive intermediates with the apoprotein in a manner that destroys heme function or binding	0.09	0.06		[85] 11259321

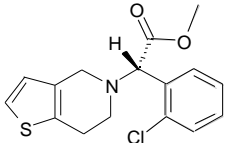
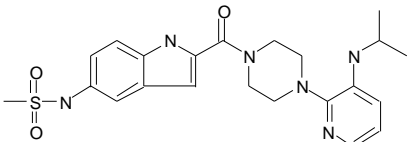
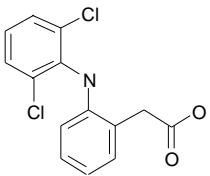
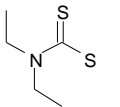
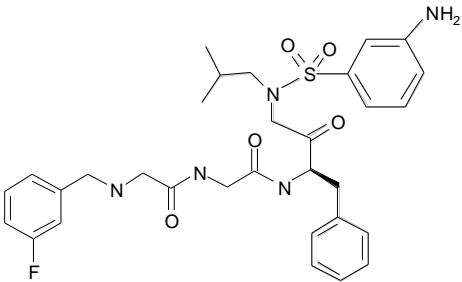
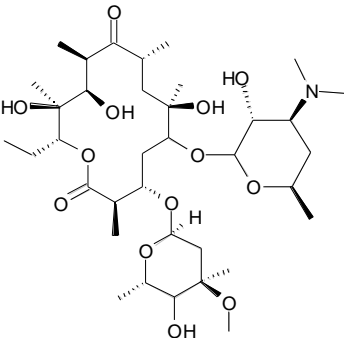
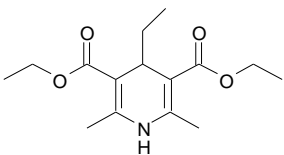
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
79	Ritonavir		CYP3A4	Different kinact values were measured for intestinal microsomes (0.078 min ⁻¹) and recombinant CYP3A4 (0.135 min ⁻¹). Reported partition ratio was calculated on recombinant CYP3A4		0.078-0.135	10	[87] 9616191
			CYP3A	Triazolam hydroxylation was used as a measure of CYP3A activity				[88] 10952482
			CYP3A4 CYP3A5	Testosterone hydroxylation was used as a marker for CYP3A activity. Reported K _i and kinact values refer to CYP3A4 and CAP3A5 respectively. MI complex formation on CYP3A4.	0.10-0.12	0.32-0.08		[89] 15523003
80	Sydnone		CYP1A1 CYP1A2 CYP3A4					[90] 9107543
81	3-[2-(2,4,6-trimethylphenyl)thioethyl]-4-methylsydnone (TTMS)		CYP1A1 CYP1A2 CYP3A4	EROD, Dextromethorphan O-demethylase and Testosterone 6-beta hydroxylase activities were measured as probe activities for CYP1A1/1A2, CYP2D6 and CYP3A4 respectively				[90] 9107543
82	Tacrine (THA)		CYP1A2	7-Ethoxyresorufin-O-deethylation was measured as a marker of CYP1A2 activity. Formation of a carbocation intermediate or a free radical	1.94	0.091	22	[91] 15258105
83	Tamoxifen		CYP2B6	7-EFC O-deethylation was used as a marker activity for CYP2B6. Modification of the apoprotein	0.9	0.02		[92] 12023523
			CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylation was used as a probe activity for CYP3A4. MI complex formation				[93]
			CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a specific activity for CYP3A. MI complex formation	0.2	0.04		[94] 12419016
84	Desmethyl tamoxifen		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as a specific activity for CYP3A	2.6	0.08		[94] 12419016
			CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylation was used as a probe activity for CYP3A4	12	0.13		[93]

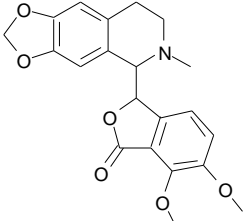
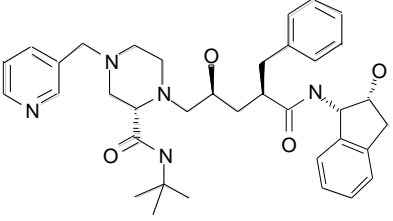
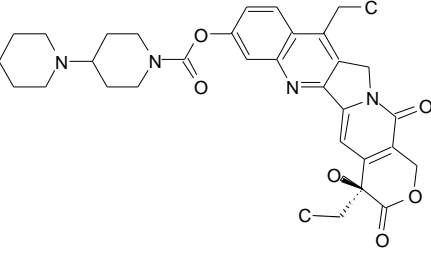
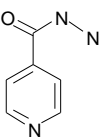
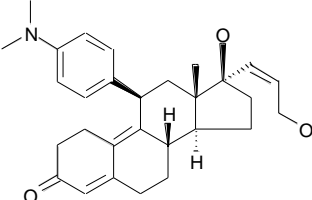
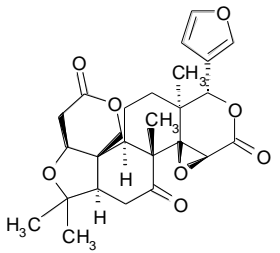
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
85	Amiodarone		CYP2C8	Paclitaxel hydroxylation was used as a marker for CYP2C8 activity. KI and kinact measured both in recombinant systems (first reported value) and in HLM (second reported value).	1.5-51.2	0.079-0.029		[14] 15304522
86	Amprenavir		CYP3A4	Transformation of triazolam into its alpha-hydroxy and 4-hydroxy metabolites was used as an index of CYP3A activity.				[88] 10952482
			CYP3A4 CYP3A5	Testosterone hydroxylation was used as a marker for CYP3A activity. Reported KI and kinact values refer to CYP3A4 and CYP3A5 respectively. MI complex formation on CYP3A4.	0.26-0.20	0.73-0.35		[89] 15523003
87	Azamulin		CYP3A4 CYP3A5	Preliminary data showing time and NADPH dependency of the inhibition potency.				[95] 14709627
88	N-(3,5-dichloro-4-pyridyl)-3-(prop-2-ynoxy)-4-methoxybenzamide		CYP2B6	N-(3,5-dichloro-4-pyridyl)-3-(cyclopentoxy)-4-methoxybenzamide (DCMB) hydroxylase activity was used as a marker of CYP2B6 activity. Heme or protein alkylation by a reactive ketene intermediate	5.1	0.09		[96] 12485950
89	Cimetidine		CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylation was used as a marker of CYP2D6 activity	77.0	0.03		[97] 15039301
			CYP2C19 CYP2C9	Weak CYP2C9 inhibition. S-warfarin and tolbutamide were used as specific substrates for CYP2C9; S-mephenytoin hydroxylation was used as specific CYP2C19 activity				[98] 8806399
90	Citrus Grandis (Banpeju) juice	No specific compounds identified	CYP3A	Midazolam 1'-hydroxylation was used as a test for CYP activity				[99] 12951492
91	Citrus hassaku (Hassaku orange) juice	No specific compounds identified	CYP3A	Midazolam 1'-hydroxylation was used as a test for CYP activity				[99] 12951492
92	Clarithromycin		CYP3A4	Formation of inhibitory P450 Fe(2+)-metabolite complexes	5.49	0.072		[21] 10950845

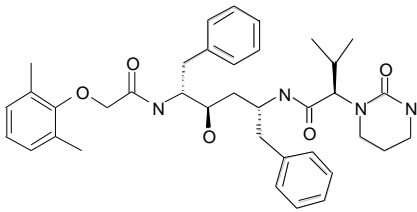
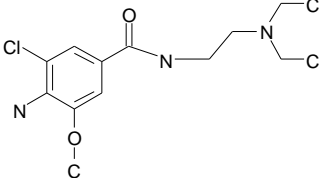
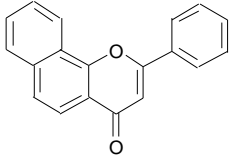
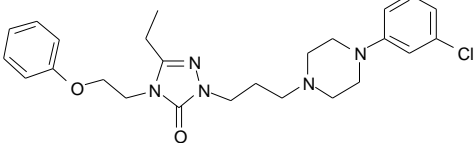
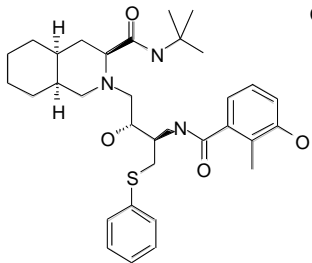
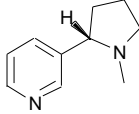
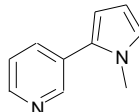
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
93	Clopidogrel		CYP2B6 CYP2C19	Alkylation of the apoprotein	0.5	0.35		[42] 14563790
94	Delavirdine		CYP3A4					[100] 11124228
			CYP3A4	Triazolam 1'-hydroxylation was measured as a probe for CYP3A4 activity. Covalent binding to microsomal proteins	12.70-30.50	0.510-0.670	41	[101] 9765359
95	Diclofenac		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as specific activity for CYP3A4. Covalent binding of reactive metabolites to the enzyme active site	1640	0.246		[102] 12228192
96	Diethyl dithiocarbamate		CYP2A6 CYP2E1					[75] 9695717
97	DPC 681		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylase activity was used as a probe for CYP3A4 activity	0.24	0.22		[103] 12920173
98	Erythromycin		CYP3A4	Triazolam alpha- and 4-hydroxylation were measured as probe activities for CYP3A4 inhibition. k _{inact} values: 0.062 (alpha-OH, HLM), 0.055 (4-OH, HLM), 0.173 (alpha-OH, REC), 0.097 (4-OH, REC)				[104] 10870985
			CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured to assess CYP3A4 activity. MI complex formation with Fe(II) of the heme moiety				[105] 9806945
99	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-ethylpyridine (DDEP)		CYP1A1 CYP1A2 CYP3A4 CYP2C9	EROD, Diclofenac 4-hydroxylase, Dextromethorphan O-demethylase and Testosterone 6-beta hydroxylase activities were measured as probe activities for CYP1A1/1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 respectively				[90] 9107543

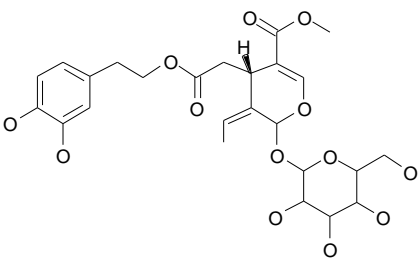
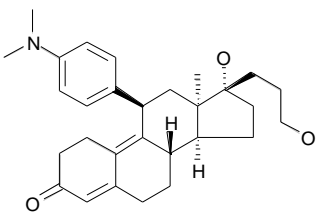
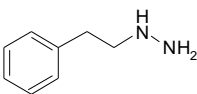
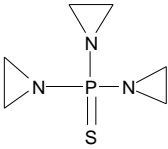
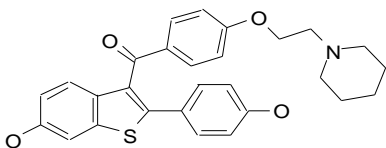
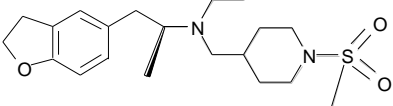
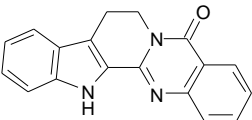
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μ M)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
100	Hydrastine		CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	Testosterone beta-hydroxylation was used as a marker of CYP3A4 activity, diclofenac 4-hydroxylation of CYP2C9 and bufuralol 1'-hydroxylation of CYP2D6 activity. MI complex formation	110	0.23		[106] 14570772
101	Indinavir	 Chiral	CYP3A4 CYP3A5	Testosterone hydroxylation was used as a marker for CYP3A activity. Reported KI and kinact values refer to CYP3A4. MI complex formation on CYP3A4	0.48	0.22		[89] 15523003
102	Irinotecan (CPT-11)		CYP3A4		24	0.06		[107] 11901092
103	Isoniazid		CYP1A2 CYP2A6 CYP2C19 CYP3A4	CYP1A2, 2A6, 2C19 and 3A4 activities were evaluated using respectively the following specific substrates: phenacetin, coumarin, tolbutamide, S-mephenytoin	56	0.11		[108] 11868802
			CYP2C8	Paclitaxel hydroxylation was used as a marker for CYP2C8 activity. KI and kinact measured both in recombinant systems (first reported value) and in HLM (second reported value). MI complex formation	374- 170	0.042- 0.012		[14] 15304522
104	Lilopristone		CYP3A4	<i>In vivo</i> data				[109] 9697076
105	Limonin		CYP3A4	(14C)formaldehyde production from (N-methyl - 14C)-erythromycin was used as a probe activity for CYP3A4	23.2	0.266		[110] 15770073

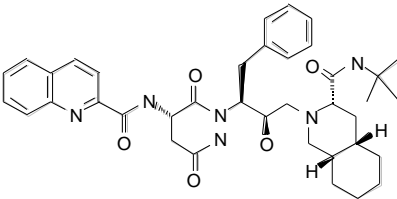
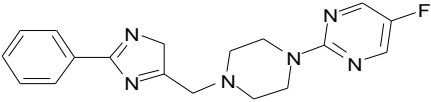
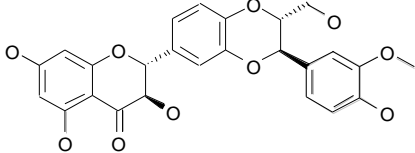
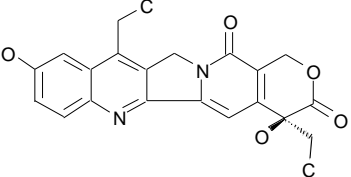
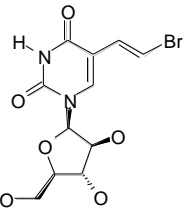
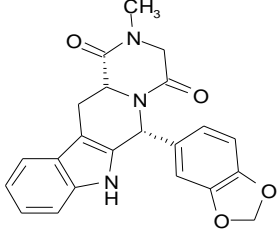
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
106	Lopinavir		CYP3A					[111] 12724045
			CYP3A4 CYP3A5	Testosterone hydroxylation was used as a marker for CYP3A activity. Reported K _i and k _{inact} values refer to CYP3A4 and CYP3A5 respectively.	0.41- 1.00	0.10- 0.05		[89] 15523003
107	Metoclopramide		CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylation was used as specific activity for CYP2D6	0.96	0.026		[112] 11854155
108	alpha-Naphthoflavone		CYP3A4 CYP3A6	Testosterone and progesterone 6-beta hydroxylation were used as marker activities for CYP3A6; testosterone 6-beta hydroxylation was used for CYP3A4.	80.1		21	[113] 11640917
109	Nefazodone		CYP3A4	1'-hydroxymidazolam production was used as a marker for CYP3A4 activity. Hypothesis of covalent modification of the apoprotein.				[114] 15523046
110	Nelfinavir	 Chiral	CYP3A4 CYP3A5	Testosterone hydroxylation was used as a marker for CYP3A activity. Reported K _i and k _{inact} values refer to CYP3A4 and CYP3A5 respectively. MI complex detected for CYP3A4.	0.48- 0.57	0.22- 0.47		[89] 15523003
111	Nicotine		CYP2A6	To measure CYP2A6 activity coumarin 7-hydroxylation was determined		71.1		[115] 14757175
112	beta-Nicotryne		CYP2A6	To measure CYP2A6 activity coumarin 7-hydroxylation was determined		6.25		[115] 14757175

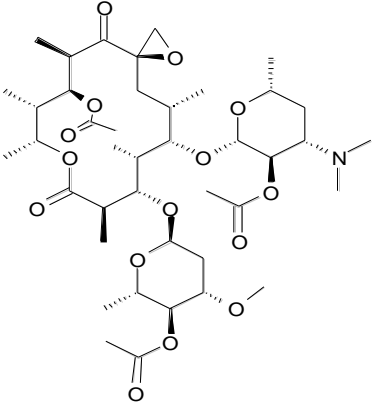
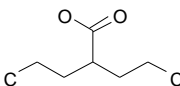
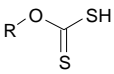
(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
113	Oleuropein		CYP3A	Androstenedione 6-beta-hydroxylation was used as specific CYP3A activity marker. Covalent binding within the enzyme active site	22.2	0.09		[116] 11527571
114	Onapristone		CYP3A4	<i>In vivo</i> data				[109] 9697076
115	Phenelzine		CYP2C8	Paclitaxel hydroxylation was used as a marker for CYP2C8 activity. KI and kinact measured both in recombinant systems (first reported value) and in HLM (second reported value). Heme destruction by free radicals	1.2-54.3	0.243-0.17		[14] 15304522
116	N,N',N''-Triethylenethio phosphoramidate (tTEPA)		CYP2B6 CYP2B1	Binding to apoprotein of CYP2B1 and binding to heme of CYP2B6. Reported KI, kinact and partition ratio values refer respectively to CYP2B1 and CYP2B6	31.0-50.0	0.3-0.1	166 - 96	[117] 15121764
			CYP2B6	Bupropione was used as a CYP2B6 substrate. Modification of apoprotein. Reported KI and kinact values refer to HLM and to recombinant CYP respectively.	3.8-2.2	0.016-0.017		[118] 15652242
117	Raloxifene		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was used as specific 3A4 activity. Covalent modification of the apoprotein by reactive metabolites, possibly arene oxide	9.9	0.16		[119] 12119000
118	RO115-1954		CYP2D6	Bufurarol hydroxylation was measured to assess the inhibition of CYP2D6; reported KI and kinact were measured on liver microsomes	1.42	22.8		[120]
119	Rutaecarpine		CYP3A4	(14C)formaldehyde production from (N-methyl-14C)-erythromycin was used as a probe activity for CYP3A4	107.7	0.387		[110] 15770073

(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
120	Saquinavir	 Chiral	CYP3A4 CYP3A5	Testosterone hydroxylation was used as a marker for CYP3A activity. Reported KI and kinact values refer to CYP3A4.	0.17	0.31		[89] 15523003
121	SCH 66712		CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylase activity was measured as a marker for CYP2D6 activity in HL microsomes	4.8	0.14		[121] 11353755
122	Silybin		CYP3A4 CYP2C9	Reported KI and kinact refer to CYP3A4 BFC hydroxylation activity; CYP3A4 testosterone 6-beta hydroxylation was also measured (KI=132 μM, kinact=0.08 min ⁻¹). 7-EFC O-deethylation CYP2C9 activity was also inactivated (KI=5 μM, kinact=0.14min ⁻¹). Unknown binding mode, but loss of heme is detectable.	32	0.06		[122] 15155549
123	SN-38		CYP3A4		26	0.1		[107] 11901092
124	Sorivudine		Non specified	<i>In vivo</i> data				[104] 10870985
125	Tadalafil		CYP3A4	Low potency CYP3A4 inactivation do not produces clinically significant changes in clearance of drugs metabolized by CYP3A4	12- 16	0.17- 0.25		[123] 15637532

(Table 1) contd....

	Name	Structure	Isoform	Comments	K _i (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
126	Troleandomycin		CYP3A4	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured to assess CYP3A4 activity. MI complex formation with Fe(II) of the heme moiety				[105] 9806945
127	Valproic acid		CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylation was used as specific CYP2A6 activity	9150	0.048		[124] 11736863
128	Xanthates		CYP2B1 CYP2B6	R can be from 2 to 20 C atoms long. K _i and k _{inact} have different values depending on the chain length and on the size of the substituent R	2.4- 69	0.02- 0.22		[125] 12593756

Thiophenes can be oxidized by CYPs to give electrophilic S-oxides, which generate covalent enzyme adducts (Fig. (3c)), or undergo the general reaction described for the alkenes.

3) Dichloro- and Trichloro- Ethylenes

Dichloro- and trichloro- ethylenes undergo CYP oxidation to give epoxide intermediates. Amine functions belonging to the protein sidechain within the CYP active site can open the epoxide resulting in a covalent adduct reactive metabolite-apoprotein [20] (Fig. (3d)).

4) Benzodioxoles (Methylenedioxyphenyl Compounds). Tight Binding Complex

Compounds containing a benzodioxole moiety are known to be oxidized by CYPs to generate a reactive intermediate, which is postulated to be a carbene and which forms a tight complex with the haem iron (Fe(II)) (Fig. (3e)). The methylene group that lies between the two oxygen atoms is activated (electron-poor) and thus more reactive towards the cytochromes P450.

5) Tertiary and Secondary Amines. Tight Binding Complex

N-dealkylation of alkylamines is a reaction commonly performed by CYPs; it is often followed by oxidation to hydroxylamines and then to nitroso-derivatives, which can

form metabolic intermediate (MI) complexes via tight coordinate bonding from the nitrogen lone pair to the ferrous haem iron of the CYP [21] (Fig. (3f)). Tertiary and secondary amines are substructures very frequently found in drugs and natural compounds, but their efficiency and specificity as mechanism-based inhibitors are very variable, depending on the structure of the whole molecule. The formation of metabolite intermediate (MI) complexes with the haem iron gives rise to characteristic changes in the cytochrome P450 UV/vis spectrum.



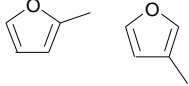
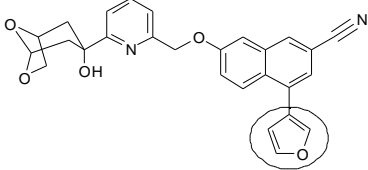
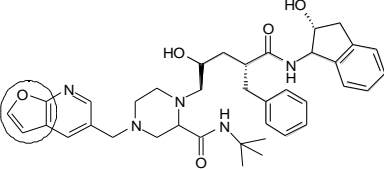
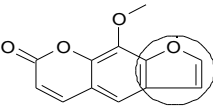
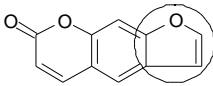
6) Thiono-Compounds

Inactivation of CYPs by compounds containing a thiono-moiety has not been completely elucidated yet. Different authors propose various hypotheses of the possible mechanisms of production of reactive metabolites and consequent CYP inactivation: haeme alkylation, protein alkylation, cross-linking between modified haeme and protein backbone. One example of a thiono-compound is methimazole: during its metabolism, there is reported evidence of the release of atomic sulphur (S), which binds to cysteine sulphhydryl groups of the cytochrome to form a hydrodisulfide (R-S-S-H) [22].

CONCLUSIONS

Irreversible inhibition of Cytochrome P450 is one of the most common causes for severe observed clinical drug-drug interaction. We hope that with this summary of the most

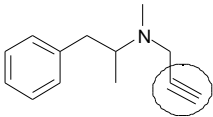
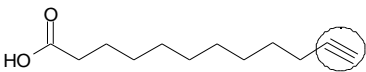
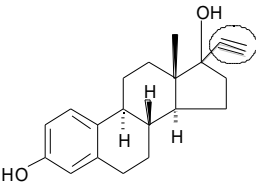
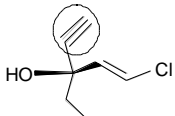
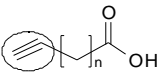
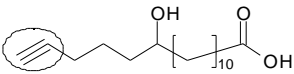
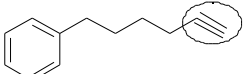
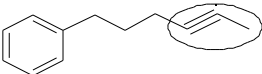
Table 2. Mechanism-Based Inhibitors on Non-Human CYP Isoforms. In the Table the Compounds Names Appear Together with the Chemical Structure, the Isoform on which they Showed Inactivation and the Animal or Plant Species they Belong to, Quantitative Parameters, Comments and the Literature References

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
1	Furan		Non specified	Rat	Covalent binding to nucleophilic groups within the apoprotein. Aniline hydroxylase, 7-ethoxycoumarin O-deethylase and 7-ethoxyresorufin O-deethylase activities were measured and found to decrease in rat liver microsomes after furan treatment <i>in vivo</i>				[18] 8492299
2	2-Methyl furan		Non specified	Rat	Production of very reactive unsaturated aldehyde acetylacrolein that binds to the microsomal proteins. <i>In vivo</i> studies were performed as well				[126] 3726888
3	Methyl furans		Non specified		Radical cation formation on the furan ring which reacts with Fe(IV)O				[19] 6719117
4	L-739,010		CYP3A	Rat Human Dog Monkey	Covalent binding to microsomal proteins				[32] 8839061
5	L-754,394		CYP3A	Rat Human Dog Monkey	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured to assess CYP3A4 inhibition. Reported KI, kinact and partition ratio values refer to human CYP3A4. Covalent binding to microsomal protein	7.5	1.62	1.4	[33] 8870 989
6	Methoxsalen (8-Methoxy-psoralen)		CYP73A1 CYP73A10 CYP73A32	Ruta graveolens	CYP73A1 is more susceptible to inhibition than CYP73A10 which is more sensitive than CYP73A32. Covalent binding to apoprotein	45.3- 2.00	0.369- 0.022		[127] 14725 859
7	Psoralen		CYP73A1 CYP73A10 CYP73A32	Ruta graveolens	CYP73A1 is more susceptible to inhibition than CYP73A32 which is more sensitive than CYP73A10. Covalent binding to apoprotein	13.22- 1.30	0.302- 0.027		[127] 14725 859

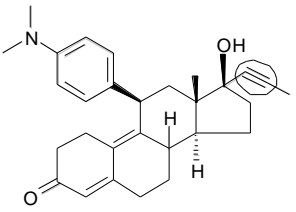
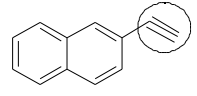
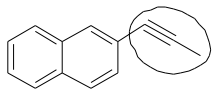
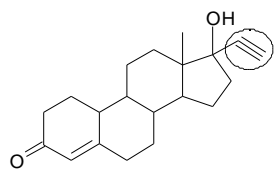
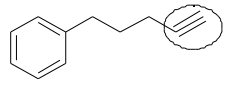
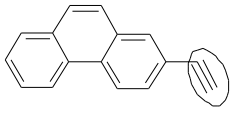
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
8	4-Ethynyl acetanilide		CYP1A1	Rat	EROD activity was measured as a probe of CYP1A1 activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	8.60	0.09		[48] 9074808
9	tert-Butyl Acetylene (tBA)		CYP2E1	Rabbit	7-EFC O-deethylation was measured to assess CYP2E1 activity. Covalent alkylation of the heme moiety and combination of heme alkylation and protein adduction	1000	0.20		[128] 12482 238
			CYP2B4	Rabbit	O-deethylation of 7-EFC was used as a probe for CYP2B4 activity. tBA modified haem products	75	0.23		[129] 15751 959
10	4-Ethynyl biphenyl		CYP1A1 CYP1A2	Rat	Reported KI and kinact refer to CYP1A1 (EROD activity); for CYP1A2 (MROD activity) they are: 0.87microM, 0.1 min ⁻¹ respectively. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.27	0.06		[48] 9074808
11	4-(1-propynyl) biphenyl		CYP1A1 CYP1A2	Rat Human	Reported KI and kinact refer to CYP1A1 (EROD activity); for CYP1A2 (MROD activity) they are: 0.013microM and 0.1 min ⁻¹ respectively. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.22	0.4		[48] 9074808
12	4-phenyl-1-butyne		CYP2b	Mouse	Dealkylation of benzyloxyresorufin was used as specific marker activity for CYP2b				[130] 8937464
			CYP2B1/2	Rat	PROD activity was measured as a probe of CYP2B activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	10.0	0.2		[48] 9074808
13	Clorgyline		CYP2B1	Rat	7-Ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin O-deethylase was used as a marker activity for CYP2B1	1.50	0.28		[131] 8781784
14	7-Ethynyl coumarin		CYP2B1	Rat	Alkylation of the apoprotein by a ketene intermediate	23.0- 27.0	0.380- 0.400	25	[132] 10775 326

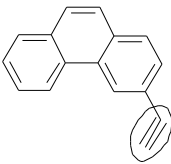
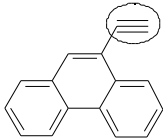
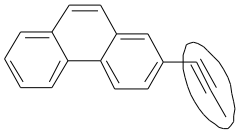
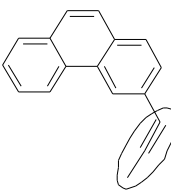
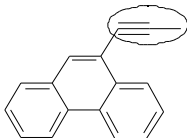
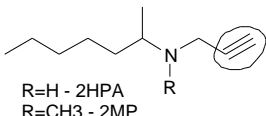
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
15	R-(-)-Deprenyl		CYP2B1	Rat	7-Ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin O-deethylase was used as a marker activity for CYP2B1	1.05	0.23	3 - 2	[131] 8781784
16	11-dodecynoic acid (11-DDYA)		Hepatic P450		Inhibition occurs on P450 catalyzing omega and omega-1 hydroxylation of fatty acids				[133]
17	17-alpha- Ethynyl estradiol		CYP2B1 CYP2B6	Human Rat	Reported kinact, KI and partition ratio values refer to CYP2B6 (human) and to CYP2B1 (rat) respectively. 7-EFC O-deethylation was used as a marker for CYPs activity. Binding to the apoprotein	0.80- 11.00	0.030- 0.200	13.0 - 21.0	[52] 1185216
18	Ethchlorvynol		Non specified		Production of N-alkylated porphyrins and popssibly heme-protein adducts				[3] 9248661
			Non specified	Rat	Alkylation of the porphyrinic moiety				[134] 7143353
19	Acetylenic fatty acids		CYP4A	Rabbit					[135] 9168258
			CYP4A CYP2B4	Rabbit	Alkylation of the apoprotein				[136] 8995277
			P450 form 5	Rabbit	Lauric acid omega and omega-1 hydroxylase activities were measured				[137] 2910864
20	12-hydroxy-16-heptadecynoic acid		CYP4A4	Rabbit					[135] 9168258
21	6-Phenyl-1-hexyne		CYP2B1/2	Rat	PROD activity was measured as a probe of CYP2B activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	6.90	0.70		[48] 9074808
22	6-Phenyl-2-hexyne		CYP1A1	Rat	EROD activity was measured as a probe of CYP1A1 activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.54	0.50		[48] 9074808

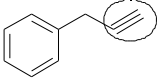
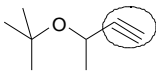
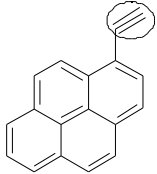
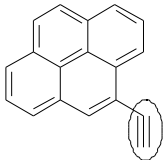
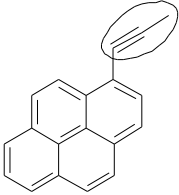
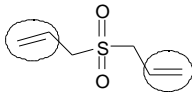
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
23	Mifepristone		CYP3A	Rat	Formation of an heme adduct that causes heme destruction				[138] 10227 577
24	2-Ethynyl Naphthalene		CYP2b	Mouse	Dealkylation of benzyloxyresorufin was used as specific marker activity for CYP2b				[130] 8937464
			CYP2B1	Rat	7-Ethoxycoumarin O-deethylase activity was used as a probe for CYP2B1 activity. Alkylation of apoprotein	0.08	0.83		[139] 8374044
			CYP2B1/2	Rat	PROD activity was measured as a probe of CYP2B activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.14	0.20		[48] 9074808
25	2-Propynyl naphthalene		CYP1A1	Rat	EROD activity was measured as a probe of CYP1A1 activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct				[48] 9074808
26	Norethindrone		Non specified	Rat	Covalent binding between heme degradation products and the apoprotein				[140] 2519716
27	5-Phenyl-1-Pentyne		CYP2b	Mouse	Dealkylation of benzyloxyresorufin was used as specific marker activity for CYP2b				[130] 8937464
			CYP2B1/2	Rat	PROD activity was measured as a probe of CYP2B activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.82	0.2		[48] 9074808
28	2-Ethynyl Phenanthrene		CYP1A1	Rat	EROD activity was measured as a probe for CYP1A1 activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.25	0.80		[48] 9074808

(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
29	3-Ethynyl Phenanthrene		CYP1A1	Rat	EROD activity was measured as a probe for CYP1A1 activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.09	0.10		[48] 9074808
30	9-Ethynyl Phenanthrene		CYP1A2 CYP2B1/2	Rat	Reported KI and kinact refer to CYP1A2 (MROD activity); for CYP2B1/2B2 (PROD activity) they are: KI 0.008 microM and kinact 0.1 min ⁻¹ . A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.03	0.04		[48] 9074808
			CYP2b	Mouse	Dealkylation of benzyloxyresorufin was used as specific marker activity for CYP2b				[130] 8937464
			CYP2B1	Rat	7-Ethoxycoumarin O-deethylase activity was used as a probe of CYP2B1 activity. Alkylation of the apoprotein	0.14	0.45		[141] 7487091
31	2-Propynyl Phenanthrene		CYP1A1 CYP1A2	Rat	EROD activity was measured as a probe for CYP1A1 activity, reported KI and kinact refer to CYP1A1; for CYP1A2 (MROD activity) they are: KI 0.030 and kinact 0.3 min ⁻¹ . A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.01	0.30		[48] 9074808
32	3-Propynyl Phenanthrene		CYP1A1		EROD activity was measured as a probe for CYP1A1 activity	0.02	0.40		[48] 9074808
33	9-Propynyl Phenanthrene		CYP2B1/2	Rat	PROD activity was used as a probe for CYP2B1/2B2 activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	2.60	0.70		[48] 9074808
34	Propargylamines (R-2HMP, R-2HPA and S-2HPA)	 R=H - 2HPA R=CH3 - 2MP	CYP2B1	Rat	7-Pentoxoresorufin was used as fluorescent probe for cytochromal activity	0.8	0.08		[142] 11454 735

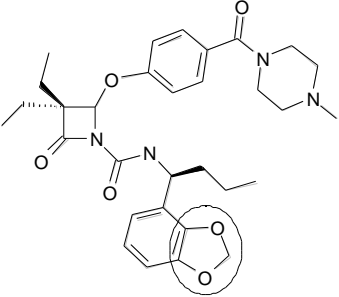
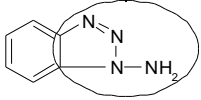
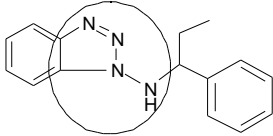
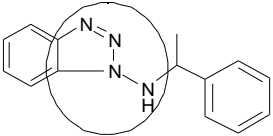
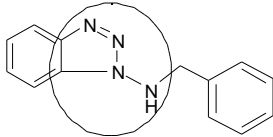
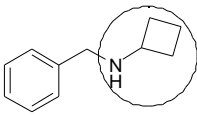
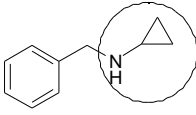
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
35	1-Phenyl-1-Propyne		CYP2B1/2	Rat	PROD activity was measured as a probe of CYP2B activity	65.00	0.70		[48] 9074808
36	tert-Butyl 1-methyl-2-propynyl Ether		CYP2B4	Rabbit	7-EFC O-deethylation activity was used as a marker of CYP2B4 activity. Formation of two different covalent adducts to the heme	37	3.2	12	[143] 15081 898
			CYP2E1	Rabbit	7-EFC O-deethylation was measured as a probe for CYP2E1 activity	100	0.12		[128] 12482 238
			CYP2B4	Rabbit	7-EFC O-deethylation activity was used as a marker of CYP2B4 activity. Formation of covalent adducts to the heme				[129] 15751 959
37	1-Ethynyl Pyrene		CYP1A1	Rat	EROD activity measured as a probe of CYP1A1 activity. A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.02	0.07		[48] 9074808
38	4-Ethynyl Pyrene		CYP1A1 CYP1A2	Rat	Reported KI and kinact refer to CYP1A1 (EROD activity); for CYP1A2 (MROD activity) they are: KI 1.2 microM and kinact 0.3 min ⁻¹ . A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.01	0.07		[48] 9074808
39	1-Propynyl Pyrene		CYP1A1 CYP1A2	Rat	EROD activity measured as a probe of CYP1A1 activity. Reported KI and kinact refer to CYP1A1; for CYP1A2 (MROD activity) they are: KI 0.004microM, kinact 0.06 min ⁻¹ . A radical-cation on the acetylene is attacked by a porphyrin-N to form a covalent adduct	0.3	0.02		[48] 9074808
40	Diallylsulfone		CYP2E1	Rat	P-nitrophenol (PNP) hydroxylase activity was used as a probe for CYP2E1 activity. Protein alkylation, heme alkylation or covalent binding of a modified heme product to the protein	188.0	0.32		[144] 1807447
			CYP2E1	Rat	<i>In vivo</i> experiments on rats were performed as well.				[145] 9084912

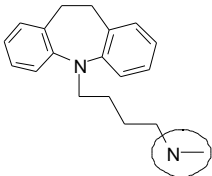
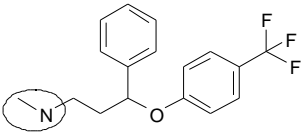
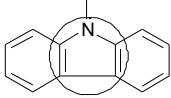
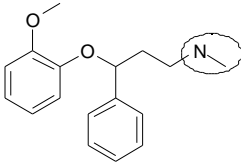
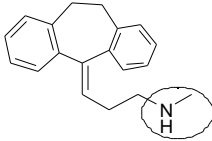
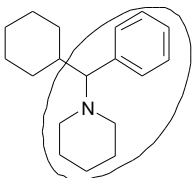
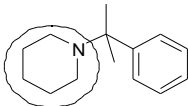
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
41	1,2-Dichloro ethylene		CYP2E1	Rat	<i>In vivo</i> studies were performed as well				[20] 9851676
42	Fluorene		Non specified	Rat	Covalent binding heme- protein				[140] 2519716
43	2,3-Biscarboethoxy- 2,3-diazabicyclo [2.2.0] hex-5-ene (DDBCH)		Non specified	Rat					[146]
44	2-Isopropyl-4- pentenamide (AIA)		Non specified	Rat	Covalent binding of heme degradation products to the apoprotein				[140] 2519716
45	18-Vinyl- progesterone (18-VP)		CYP11B1 CYP11B2		Covalent binding to the prosthetic heme group				[147] 8645613
46	Secobarbital		CYP2B	Rat	Prosthetic heme alkylation and alkylation of the apoprotein				[148] 2913486
			CYP2B1	Rat	Formation of a secobarbital-heme adduct and covalent modification of the apoprotein				[149] 8728507
47	Tiamulin		CYP3A	Goat Cattle	MI complex formation				[150] 10088 712
48	ABT-200		Non specified	Dog	Also <i>in vivo</i> studies were performed on dogs. MI complex formation				[151] 12228 185

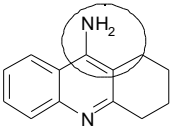
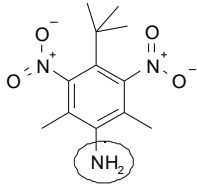
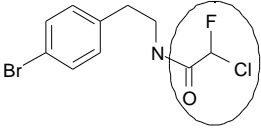
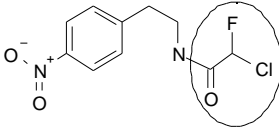
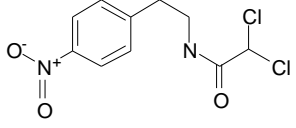
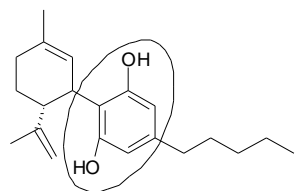
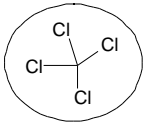
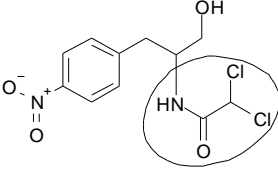
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
49	DMP777		CYP3A4	Rhesus Monkey Human	Testosterone 6-beta hydroxylation was measured to assess CYP3A residual activity. MI complex formation				[59]
50	1-Aminobenzotriazole		Non specified	Guinea pig	Covalent binding to apoprotein				[135] 9168258
51	N-(alpha-ethylbenzyl)-1-aminobenzotriazole		CYP2B	Guinea pig Rabbit					[152] 9660851
52	N-(alpha-methylbenzyl)-1-aminobenzotriazole		CYP2B	Guinea pig Rabbit					[152] 9660851
			CYP2B11 CYP3A12	Dog	Diazepam N1-demethylation was used as a probe for CYP2B11 activity. Reported KI and kinact values refer to recombinant CYP2B11 and dog liver microsomes respectively. Covalent modification of apoprotein	0.35- 0.46	1.5- 0.56		[153] 15677 349
53	N-benzyl-1-aminobenzotriazole		CYP2B	Guinea pig Rabbit					[152] 9660851
			CYP2B CYP1A	Guinea pig	Formation of free radicals which alkylate the heme moiety				[135] 9168258
54	N-cyclobutylbenzylamines		Non specified		Alkylation of the apoprotein and covalent binding of the heme to the protein				[154] 2914890
55	N-cyclopropylbenzylamine		Non specified		Alkylation of the apoprotein and covalent binding of modified heme to protein				[154] 2914890
			Non specified		Radical cation formation on the heteroatom and formation of a highly reactive carbon radical which binds to the heme		0.10	89	[155]
			CYP2B						[135] 9168258

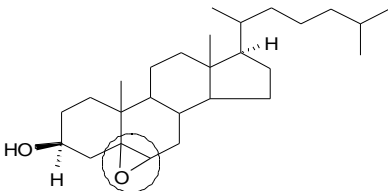
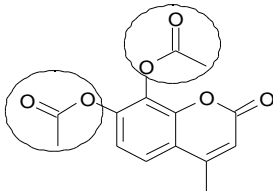
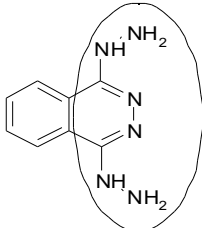
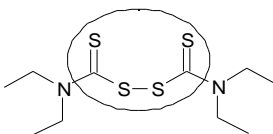
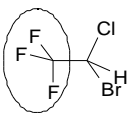
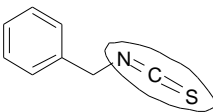
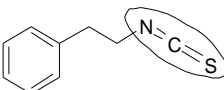
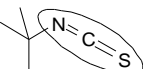
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
56	Desipramine		CYP2C11	Rat	2-alpha and 16-alpha hydroxylation of testosterone were used as marker activities for CYP2C11				[156] 14555 335
57	Fluoxetine		CYP2C11	Rat	2-alpha and 16-alpha hydroxylation of testosterone were used as marker activities for CYP2C11. MI complex formation				[156] 14555 335
58	N-Methylcarbazole		CYP2B1	Rat	Loss of spectrally detectable P450	5.2	1.4		[157] 8070309
			CYP2B4	Rabbit	Loss of spectrally detectable P450	23	0.21		[157] 8070309
59	Nisoxetine		CYP2C11	Rat	2-alpha and 16-alpha hydroxylation of testosterone were used as marker activities for CYP2C11. MI complex formation				[156] 14555 335
60	Nortriptyline		CYP2C11	Rat	Marker activities considered were testosterone 2-alpha and 16-alpha-hydroxylation. MI complex formation				[158] 1435757
			CYP2C11	Rat	2-alpha and 16-alpha hydroxylation of testosterone were used as marker activities for CYP2C11. MI complex formation				[156] 14555 335
61	Phencyclidine		CYP2B1	Rat	7-Ethoxy-4-trifluoromethyl-coumarin O-deethylase activity was measured as a marker of CYP2B1 activity. Covalent binding to apoprotein				[159] 9029055
62	2-phenyl-2-(1-piperidinyl)propane (PPP)		CYP2B1 CYP2B6 CYP2	Rat Human	Reported KI, kinact and Partition Ratio refer to CYP2B6 and 2B1, no data are available for CYP2C9. Alkylation of apoprotein	1.20- 12.0	0.07- 0.3	15 - 31	[71] 10901 699

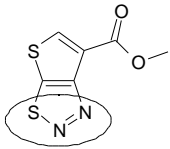
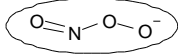
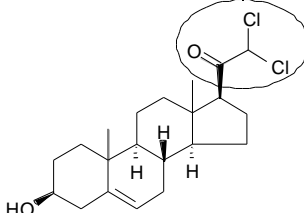
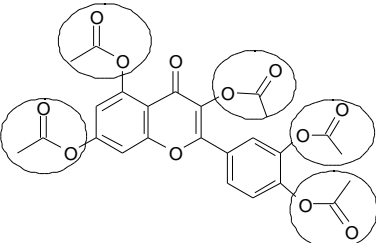
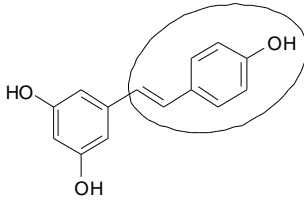
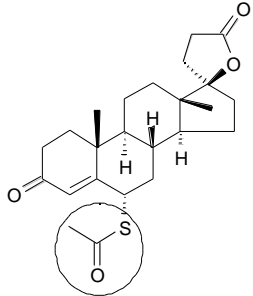
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
63	Tacrine (THA)		CYP1A2	Human Rat	7-Ethoxyresorufin-O-deethylation was measured as a marker of CYP1A2 activity. Formation of a carbocation intermediate or a free radical	1.94	0.091	22	[91] 15258 105
64	4-amino-2,6-dinitro-1-t-butyl xylene		CYP2B10	Mouse					[160] 9172959
65	N-(2-p-bromophenethyl) chlorofluoro acetamide		CYP2B1	Rat	Specific activities measured: androstenedione 16-beta-hydroxylation and R- and S- warfarin hydroxylation				[161] 1971568
66	N-(2-p-nitrophenethyl) chlorofluoro acetamide		CYP2B1	Rat	Specific activities measured: androstenedione 16-beta-hydroxylation and R- and S- warfarin hydroxylation				[161] 1971568
67	N-(2-p-nitrophenethyl) dichloro acetamide		P-450 BNF-B	Rat	Enzymatic activities tested were: Ethoxyresorufin O-deethylation, warfarin R-6 and R-8 hydroxylation	2.7	0.52		[162] 2893712
68	Cannabidiol (CBD)		CYP3A CYP2C	Mouse	THC metabolism was measured, as a marker of cytochrome activity in liver microsomes. Covalent binding to the apoprotein				[163] 8466552
			CYP3A11	Mouse	Covalent binding to apoprotein				[164] 9778318
69	Carbon tetrachloride		Non specified	Rat	Covalent binding of heme degradation products to the apoprotein				[140] 2519716
70	Chloramphenicol		Non specified	Rat					[165] 7132955
			CYP2C6 CYP2C11 CYP2B1/2	Rat					[166] 7932191

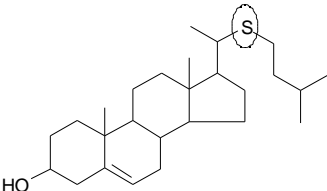
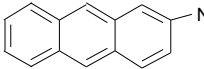
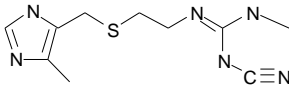
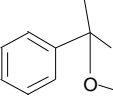
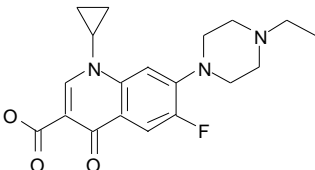
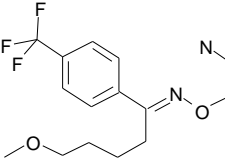
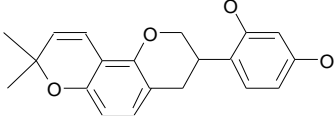
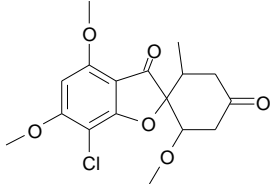
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
71	alpha-5,6-epoxy cholesterol		P450 prothoracic gland	Manduca sexta					[167] 7627200
72	7,8-diacetoxy-4- methyl coumarin (DAMC)		CYP1A CYP2B	Rat	EROD and PROD activities were measured as probes of CYP1A and 2B activity. Acetylation of the enzyme				[168] 9839019
			Non specified	Rat	AFB1-DNA binding after preincubation of P450 with DAMC was used as a probe for P450 inactivation				[169] 12182 864
73	Dihydralazine		CYP1A2	Rat	Penacetine O-deethylase activity was used as marker for CYP1A2 activity		0.060- 0.085		[170] 9531521
74	Disulfiram			Rat	<i>In vivo</i> studies; decrease of the liver P450 levels				[171] 3787626
75	Halothane		Non specified	Rat	Trifluoroacetylated adducts				[172] 3903473
76	Benzyl isothiocyanate (BITC)		CYP2B1	Rat	The deethylation of 7-EFC was used to assess CYP2B1 activity. Covalent binding to the apoprotein in proximity of the heme	5.8	0.66	9.0	[173] 11123 978
77	Phenethyl isothiocyanate		CYP2B1	Rat	7-EFC deethylation activity was measured as a probe for CYP2B1 activity. Covalent modification of apoprotein				[78] 11454 729
78	tert-Butyl isothiocyanate (tBITC)		CYP2E2	Rabbit Rat	P-nitrophenol hydroxyla- tion activity was used as a marker of CYP2E1 activity. Covalent binding to apo-protein in proximity of the active site				[174] 9778311

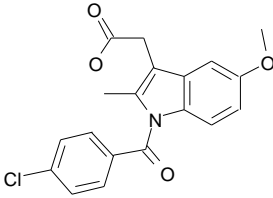
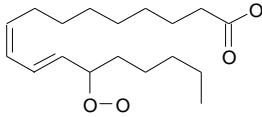
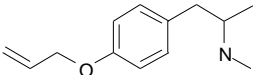
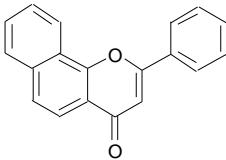
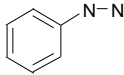
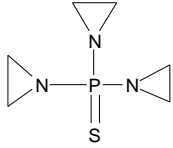
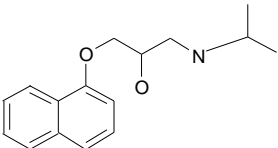
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
79	MTTC (1,2,3-thiadiazole)		CYP2E1 CYP2B4	Rabbit	1-Phenylethanol oxidation was used as probe activity for the examined P450; reported kinact, KI and partition ratio refer to CYP2E1; for CYP2B4 they are respectively: 0.04+/-0.003 min ⁻¹ ; 2000+/-60 microM; 2100+/-150	93.0-107	0.075-0.085	95 - 125	[175] 9188722
80	Peroxynitrite		CYP2B1	Rat	EFC deethylation was used as a marker for CYP2B1 catalytical activity. Nitration of Tyrosine residues of the apoprotein to 3-nitrosotyrosine				[176] 9760281
81	21,21-dichloro pregnenolone		CYP2C5	Rabbit					[135] 9168258
82	Quercetin pentaacetate		Non specified	Rat	Aflatoxin B1-epoxydation and subsequent covalent binding to DNA was used as probe for microsomal P450. Apoprotein acetylation				[169] 12182864
83	trans-Resveratrol		CYP3A4	Rat Human	Testosterone 6-beta hydroxylase activity was measured as a probe for CYP3A activity				[84] 11701226
84	Spironolactone		Non specified	Rat	Peroxidative heme destruction and covalent binding of heme derivatives to the apoprotein				[177] 3487316
			Non specified	Rat	Microsomal activities measured were: 2-beta, 6-beta, 15-beta and 18-hydroxylation of testosterone. Covalent binding of prosthetic heme to the apoprotein	17.0	0.08	19.5-24.9	[178] 2765527

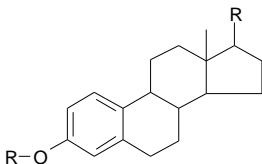
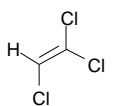
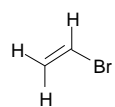
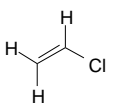
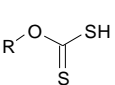
(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
85	(20S)-22-Thiacholesterol		P-450 _{sc}	Bovine	Coordination of the oxygen of the sulfoxide with the heme center				[179] 7599132
86	2-Amino anthracene		CYP1A	Channel catfish	EROD activity was used as a marker for CYP1A activity				[180] 8545829
87	Cimetidine		CYP2C11	Rat	Testosterone 2-alpha hydroxylase activity was used as a marker for CYP2C11 activity. Formation of a MI complex				[181] 1545403
88	Cumene hydroperoxide		CYP2B1	Rat	The heme moiety is converted into fragments that alkylate the apoprotein				[182] 8416964
89	Enrofloxacin		CYP3A4 CYP3A27	Sea bass	Erythromycin N-demethylase and testosterone 6-beta hydroxylase were used as markers for CYP3A4 and 3A27 activity. Covalent binding	3.7	0.045		[183] 12413791
90	Fluvoxamine		CYP1A2	Rat	Fluvoxamine CYP1A2 inhibition was monitored through the effects on zolmitriptan metabolism	57.4	0.16		[184] 14642738
91	Gingko biloba extracts	No specific compounds identified	CYP3A	Rat	Preliminary data showing NADPH and time-dependence of gingko extracts cytochromal inhibition				[185] 12951478
92	Glabridin		CYP3A4 CYP2B6		7BFC O-debenzylation and 7EFC O-deethylation activities were used as markers for CYP3A4 and CYP2B6 activity respectively. Covalent binding that causes the destruction of the heme moiety	7.0	0.14		[186] 12019199
93	Griseofulvin				<i>In vivo</i> studies. N-alkylation of porphyrin				[3] 9248661

(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
94	Indomethacin		CYP3A2	Rat	<i>In vivo</i> studies were performed as well. Covalent binding to apoprotein				[187] 11875 010
95	Linoleic hydroperoxyde		Non specified	Rat	Covalent binding heme-protein				[140] 2519716
96	4-Allyloxy methamphetamine		CYP2D	Rat	Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) demethylation was used as a marker for CYP2D activity.				[188] 8627536
97	alpha-Naphthoflavone		CYP3A4 CYP3A6	Human Rabbit	Testosterone and progesterone 6-beta hydroxylation were used as marker activities for CYP3A6; testosterone 6-beta hydroxylation was used for CYP3A4.	80.1		21	[113] 11640 917
98	Nitric oxide	N=O	CYP2C11 CYP3A2	Rat	Testosterone hydroxylation was measured as a probe activity for P450. Irreversible CYP inactivation via the thiol modification pathway				[189] 9400024
99	Phenylhydrazine		Non specified	Rat	Covalent binding between heme degradation products and the apoprotein				[140] 2519716
100	N,N',N''-Triethylenethio phosphoramidate (rTEPA)		CYP2B6 CYP2B1	Human Rat	Reported Ki, kinact and partition ratio values refer respectively to CYP2B1 and CYP2B6. Binding to apoprotein of CYP2B1 and binding to heme of CYP2B6	31.0- 50.0	0.3- 0.1	166 - 96	[117] 15121 764
101	Propranolol		P450BTL (CYP2D family)	Rat	Covalent binding to apoprotein				[190] 7986200

(Table 2) contd....

	Name	Structure	Isoform	Species	Comments	KI (μ M)	kinact (min ⁻¹)	Partition Ratio	Ref. (PMID)
102	Thiosteroids		CYP3A	Rat					[135] 9168258
			CYP3A	Rat	KI and kinact data refer to protein loss; many more data for different microsomal activities are reported in the paper. Destruction of the heme moiety to reactive products that alkylate the apoprotein in the active site	50.6	9.01		[191] 1581535
103	Trichloroethylene		Non specified	Rat	Covalent binding heme-protein				[140] 2519716
			CYP2E1	Rat	<i>In vivo</i> studies were performed as well				[20] 9851676
104	Vinyl Bromide		Non specified	Rat	Covalent binding heme-protein				[140] 2519716
105	Vinyl Chloride		Non specified	Rat	Covalent binding heme-protein				[140] 2519716
106	Xanthates		CYP2B1 CYP2B6 CYP2E1	Rat	7-EFC O-deethylation was used as a probe activity for CYP2B1. KI and kinact have different values depending on the nature and the length of the fragment R, which can vary from C2 to C20	2.40- 69.00	0.020- 0.220	4.0- 600.0	[192] 10220 489

common structural features which are responsible for CYP inactivation, medicinal chemists will have a quick reference guide to assist them in designing new safer drugs.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Prof. Paul F. Hollenberg for reviewing the manuscript and for his encouraging comments and helpful suggestions.

ABBREVIATIONS

CYP = Cytochrome P450

MI = Metabolite-intermediate

GSH = Reduced glutathione

REFERENCES

- [1] Guengerich, F.P. (2001) *Chem. Res. Toxicol.*, **14**(6), 611-650.
- [2] Yun, C.; Lee, H.S.; Lee, H.; Rho, J.K.; Jeong, H.G. and Guengerich F.P. (1995) *Drug Metab. Dispos.*, **23**(2), 285-289.
- [3] Murray, M. (1997) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **24**(7), 465-470.
- [4] Knowles, S.R.; Uetrecht, J. and Shear, N.H. (2000) *Lancet*, **356**(9241), 1587-1591.
- [5] Li, A.P. (2002) *Chem. Biol. Interact.*, **142**(1-2), 7-23.
- [6] Bourdi, M.; Chen, W.; Peter, R.M.; Martin, J.L.; Buters, J.T.; Nelson, S.D. and Pohl, L.R. (1996) *Chem. Res. Toxicol.*, **9**(7), 1159-1166.
- [7] Ortiz de Montellano, P.R. In *Progress in Drug Metabolism*, (Gibson G.G. Ed.), Taylor & Francis, London, pp. 99-148.
- [8] Rendic, S. and Di Carlo, F.J. (1997) *Drug Metab. Rev.*, **29**(1-2), 413-580.
- [9] Hollenberg, P.F. (2002) *Drug Metab. Rev.*, **34**(1-2), 17-35.
- [10] Kent, U.M.; Juschyshyn, M.I. and Hollenberg, P.F. (2001) *Curr. Drug. Metab.*, **2**(3), 215-243.
- [11] Zhou, S.; Koh, H.L.; Gao, Y.; Gong, Z.Y. and Lee, E.J. (2004) *Life Sci.*, **74**(8), 935-968.
- [12] Zhou, S.; Chan, E.; Duan, W.; Huang, M. and Chen, Y.Z. (2005) *Drug Metab. Rev.*, **37**(1), 41-213.
- [13] Zhou, S.; Chan, E.; Yong Lim, L.; Boelsterli, U.A.; Li, C.S.; Wang, J.; Zhang, Q.; Huang, M. and Xu, A. (2004) *Curr. Drug. Metab.*, **5**(5), 415-442.
- [14] Zhou, S.; Yung Chan, S.; Cher Goh, B.; Chan, E.; Duan, W.; Huang, M. and McLeod, H.L. (2005) *Clin. Pharmacokinet.*, **44**(3), 279-304.
- [15] Polasek, T.M.; Elliot, D.J.; Lewis, B.C. and Miners, J.O. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**(3), 966-1007.
- [16] Silverman, R.B. (1995) In *Methods in Enzymology*, Vol. **249**, pp. 240-283.
- [17] Wirth, P.J.; Bettis, C.J. and Nelson, W.L. (1976) *Mol. Pharmacol.*, **12**(5), 759-768.

- [18] Parmar, D. and Burka, L.T. (1993) *J. Biochem. Toxicol.*, **8**(1), 1-9.
- [19] Ravindranath, V.; Burka, L.T. and Boyd, M.R. (1984) *Science*, **224**(4651), 884-886.
- [20] Lilly, P.D.; Thornton-Manning, J.R.; Gargas, M.L.; Clewell, H.J. and Andersen, M.E. (1998) *Arch. Toxicol.*, **72**(10), 609-621.
- [21] Mayhew, B.S.; Jones, D.R. and Hall, S.D. (2000) *Drug Metab. Dispos.*, **28**(9), 1031-1037.
- [22] Lee, P.W. and Neal, R.A. (1978) *Drug Metab. Dispos.*, **6**(5), 591-600.
- [23] Guo, L.; Fukuda, K.; Ohta, T. and Yamazoe, Y. (2000) *Drug Metab. Dispos.*, **28**(7), 766-771.
- [24] He, K.; Iyer, K.R.; Hayes, R.N.; Sinz, M.W.; Woolf, T.F. and Hollenberg, P.F. (1998) *Chem. Res. Toxicol.*, **11**(4), 252-259.
- [25] Tassaneeyakul, W.; Guo, L.; Fukuda, K.; Ohta, T. and Yamazoe, Y. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **378**(2), 356-363.
- [26] Lin, H.L.; Kent, U.M. and Hollenberg, P.F. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **313**(1), 154-164.
- [27] Schmiedlin-Ren, P.; Edwards, D.J.; Fitzsimmons, M.E.; He, K.; Lown, K.S.; Woster, P.M.; Rahman, A.; Thummel, K.E.; Fisher, J.M.; Hollenberg, P.F. and Watkins, P.B. (1997) *Drug Metab. Dispos.*, **25**(11), 1228-1233.
- [28] Racha, J.K.; Rettie, A.E. and Kunze, K.L. (1998) *Biochemistry*, **37**(20), 7407-7419.
- [29] Clarke, S.E.; Ayrton, A.D. and Chenery, R.J. (1994) *Xenobiotica*, **24**(6), 517-526.
- [30] Guo, L.-Q.; Taniguchi, M.; KXiao, Y.-Q.; Baba, K.; Ohta, T. and Yamazoe, Y. (2000) *Jp. J. Pharmacol.*, **82**(2), 122-129.
- [31] Alvarez-Diez, T.M. and Zheng, J. (2004) *Chem. Res. Toxicol.*, **17**(2), 150-157.
- [32] Zhang, K.E.; Naue, J.A.; Arison, B. and Vyas, K.P. (1996) *Chem. Res. Toxicol.*, **9**(2), 547-554.
- [33] Sahali-Sahly, Y.; Balani, S.K.; Lin, J.H. and Baillie, T.A. (1996) *Chem. Res. Toxicol.*, **9**(6), 1007-1012.
- [34] Chiba, M.; Nishime, J.A. and Lin, J.H. (1995) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**(3), 1527-1534.
- [35] Lightning, L.K.; Jones, J.P.; Friedberg, T.; Pritchard, M.P.; Shou, M.; Rushmore, T.H. and Trager, W.F. (2000) *Biochemistry*, **39**(15), 4276-4287.
- [36] Khojasteh-Bakht, S.C.; Chen, W.; Koenigs, L.L.; Peter, R.M. and Nelson, S.D. (1999) *Drug Metab. Dispos.*, **27**(5), 574-580.
- [37] Khojasteh-Bakht, S.C.; Koenigs, L.L.; Peter, R.M.; Trager, W.F. and Nelson, S.D. (1998) *Drug Metab. Dispos.*, **26**(7), 701-704.
- [38] Koenigs, L.L.; Peter, R.M.; Thompson, S.J.; Rettie, A.E. and Trager, W.F. (1997) *Drug Metab. Dispos.*, **25**(12), 1407-1415.
- [39] Koenigs, L.L. and Trager, W.F. (1998) *Biochemistry*, **37**(28), 10047-10061.
- [40] von Weymarn, L.B.; Zhang, Q.Y.; Ding, X. and Hollenberg, P.F. (2005) *Carcinogenesis*, **26**(3), 621-629.
- [41] O'Donnell, J.P.; Dalvie, D.K.; Kalgutkar, A.S. and Obach, R.S. (2003) *Drug Metab. Dispos.*, **31**(11), 1369-1377.
- [42] Richter, T.; Mordt, T.E.; Heinkle, G.; Pleiss, J.; Tatzel, S.; Schwab, M.; Eichelbaum, M. and Zanger, U.M. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**(1), 189-197.
- [43] Ha-Duong, N.T.; Dijols, S.; Macherey, A.-C.; Goldstein, J.A.; Dansette, P.M. and Mansuy, D. (2001) *Biochemistry*, **40**(40), 12112-12122.
- [44] Jean, P.; Lopez-Garcia, P.; Dansette, P.; Mansuy, D. and Goldstein, J.L. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **241**(3), 797-804.
- [45] Lopez-Garcia, M.P.; Dansette, P.M. and Mansuy, D. (1994) *Biochemistry*, **33**(1), 166-175.
- [46] Lu, P.; Schrag, M.L.; Slaughter, D.E.; Raab, C.E.; Shou, M. and Rodrigues, A.D. (2003) *Drug Metab. Dispos.*, **31**(11), 1352-1360.
- [47] Shimada, T.; Yamazaki, H.; Foroozesh, M.; Hopkins, N.E.; Alworth, W.L. and Guengerich, F.P. (1998) *Chem. Res. Toxicol.*, **11**(9), 1048-1056.
- [48] Foroozesh, M.; Primrose, G.; Guo, Z.; Bell, L.C.; Alworth, W.L. and Guengerich, F.P. (1997) *Chem. Res. Toxicol.*, **10**(1), 91-102.
- [49] Lin, H.-L.; Kent, U.M. and Hollenberg, P.F. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**(1), 160-167.
- [50] Palovaara, S.; Kivistö, K.T.; Tapanainen, P.; Manninen, P.; Neuvonen, P.J. and Laine, K. (2000) *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **50**(4), 333-337.
- [51] Mills, D.; Kent, U.M. and Hollenberg, P.F. (1999) *ISSX Proceedings*, **15**, 97.
- [52] Kent, U.M.; Mills, D.E.; Rajnarayanan, R.V.; Alworth, W.L. and Hollenberg, P.F. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**(2), 549-558.
- [53] Kim, B.R.; Oh, H.S. and Kim, D.H. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**(4), 839-846.
- [54] Guengerich, F.P. (1990) *Chem. Res. Toxicol.*, **3**(4), 363-371.
- [55] He, K.; Woolf, T.F. and Hollenberg, P.F. (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**(2), 791-797.
- [56] De Groene, E.M.; Nijmeijer, S.M.; Horbach, G.J. and Witkamp, R.F. (1995) *Biochem. Pharmacol.*, **50**(6), 771-773.
- [57] Usia, T.; Watabe, T.; Kadota, S. and Tezuka, Y. (2005) *Life Sci.*, **76**(20), 2381-2391.
- [58] Mathews, J.M.; Etheridge, A.S. and Black, S.R. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, **30**(11), 1153-1157.
- [59] Diamond, S. and Christ, D.D. (1999) *ISSX Proceedings*, **15**, 101.
- [60] Iwata, H.; Tezuka, Y.; Kadota, S.; Hiratsuka, A. and Watabe, T. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, **32**(12), 1351-1358.
- [61] Heydari, A.; Rowland Yeo, K.; Lennard, M.S.; Ellis, S.W.; Tucker, G.T. and Rostami-Hodjegan, A. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, **32**(11), 1213-1217.
- [62] Nakajima, M.; Suzuki, M.; Yamaji, R.; Takashina, H.; Shimada, N.; Yamazaki, H. and Yokoi, T. (1999) *Xenobiotica*, **29**(12), 1191-1202.
- [63] Bertelsen, K.M.; Venkatakrishnan, K.; von Moltke Lisa, L.; Obach, R.S. and Greenblatt, D.J. (2003) *Drug Metab. Dispos.*, **31**(3), 289-293.
- [64] Wang, Y.-H.; Jones, D.R. and Hall, S.D. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, **32**(2), 259-266.
- [65] Ma, B.; Prueksaritanont, T. and Lin, J.H. (2000) *Drug Metab. Dispos.*, **28**(2), 125-130.
- [66] Jones, D.R.; Gorski, J.C.; Hamman, M.A.; Mayhew, B.S.; Rider, S. and Hall, S.D. (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**(3), 1116-1125.
- [67] Yeo, K.R. and Yeo, W.W. (2001) *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **51**(5), 461-470.
- [68] Prueksaritanont, T.; Ma, B.; Tang, C.; Meng, Y.; Assang, C.; Lu, P.; Reider, P.J.; Lin, J.H. and Baillie, T.A. (1999) *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **47**(3), 291-298.
- [69] Wang, Y.-H.; Jones, D.R. and Hall, S.D. (2005) *Drug Metab. Dispos.*, **33**(5), 664-671.
- [70] Jushchyshyn, M.I.; Kent, U.M. and Hollenberg, P.F. (2003) *Drug Metab. Dispos.*, **31**(1), 46-52.
- [71] Chun, J.; Kent, U.M.; Moss, R.M.; Sayre, L.W. and Hollenberg, P.F. (2000) *Drug Metab. Dispos.*, **28**(8), 905-911.
- [72] Surh, Y.J. and Lee, S.S. (1995) *Life Sci.*, **56**(22), 1845-1855.
- [73] Masubuchi, Y. and Horie, T. (1999) *Chem. Res. Toxicol.*, **12**(10), 1028-1032.
- [74] Guengerich, F.P.; Kim, D.H. and Iwasaki, M. (1991) *Chem. Res. Toxicol.*, **4**(2), 168-179.
- [75] Kharash, E.D.; Hankins, D.C.; Baxter, P.J. and Thummel, K.E. (1998) *Clin. Pharmacol. Ther.*, **64**(1), 39-45.
- [76] Kharasch, E.D.; Hankins, D.C.; Fenstermaker, K. and Cox, K. (2000) *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **55**(11-12), 853-859.
- [77] Hutzler, J.M.; Steenwyk, R.C.; Smith, E.B.; Walker, G.S. and Wieners, L.C. (2004) *Chem. Res. Toxicol.*, **17**(2), 174-184.
- [78] Nakajima, M.; Yoshida, R.; Shimada, N.; Yamazaki, H. and Yokoi, T. (2001) *Drug Metab. Dispos.*, **29**(8), 1110-1113.
- [79] Jacobsen, W.; Christians, U. and Benet, L.Z. (2000) *Drug Metab. Dispos.*, **28**(11), 1343-1351.
- [80] Guo, Z.R.; S. White, R.B. and Stevens, J.C. (1997) *Drug Metab. Dispos.*, **25**(3), 390-393.
- [81] Langouët, S.; Furge, L.L.; Kerriguy, N.; Nakamura, K.; Guillozou, A. and Guengerich, F.P. (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, **13**(4), 245-252.
- [82] Butler, A.M. and Murray, M. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**(2), 966-973.
- [83] Lin, H.-L.; Kent, U.M.; Zhang, H.; Waskell, L. and Hollenberg, P.F. (2003) *Chem. Res. Toxicol.*, **16**(2), 129-136.
- [84] Piver, B.; Berthou, F.; Dreano, Y. and Lucas, D. (2001) *Toxicol. Lett.*, **125**(1-3), 83-91.
- [85] Chun, Y.J.; Riu, S.Y.; Yeon, T.C. and Kim, M.Y. (2001) *Drug Metab. Dispos.*, **29**(4), 389-393.
- [86] Chan, W.K. and Delucchi, A.B. (2000) *Life Sci.*, **67**(25), 3103-3112.
- [87] Koudriakova, T.; Iatsimirskaya, E.; Utkin, I.; Gangl, E.; Vourros, P.; Storozhuk, E.; Orza, D.; Marinina, J. and Gerber, N. (1998) *Drug Metab. Dispos.*, **26**(6), 552-561.
- [88] von Moltke, L.L.; Durol, A.L.B.; Duan, S.X. and Greenblatt, D.J. (2000) *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **56**(3), 259-261.

- [89] Ernest, C.S. II.; Hall, S.D. and Jones, D.R. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**(2), 583-591.
- [90] McNamee, J.P.; Jurima-Romet, M.; Kobus, S.M. and Marks, G.S. (1997) *Drug Metab. Dispos.*, **25**(4), 437-441.
- [91] Peng, J.Z.; Rimmel, R.P. and Sawchuk, R.J. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, **32**(8), 805-812.
- [92] Sridar, C.; Kent, U.M.; Notley, L.M.; Gillam, E.M. and Hollenberg, P.F. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**(3), 945-952.
- [93] Jones, D.R.; Zhao, X.-J.; Grimm, S.W. and Hall, S.D. (2000) *ISSX Proceedings*, **32**(2), 229.
- [94] Zhao, X.J.; Jones, D.R.; Wang, Y.H.; Grimm, S.W. and Hall, S.D. (2002) *Xenobiotica*, **32**(10), 863-878.
- [95] Stresser, D.M.; Broudy, M.I.; Ho, T.; Cargill, C.E.; Blanchard, A.P.; Sharma, R.; Dandeneau, A.A.; Goodwin, J.J.; Turner, S.D.; Erve, J.C.; Patten, C.J.; Dehal, S.S. and Crespi, C.L. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, **32**(1), 105-112.
- [96] Fan, P.W.; Gu, C.; Marsh, S.A. and Stevens, J.C. (2003) *Drug Metab. Dispos.*, **31**(1), 28-36.
- [97] Madeira, M.; Levine, M.; Chang, T.K.H.; Mirfazaelian, A. and Bellward, G.D. (2004) *Drug Metab Dispos.*, **32**(4), 460-467.
- [98] Levy, R.H. (1995) *Epilepsia*, **36**(Suppl 5), S8-13.
- [99] Fujita, K.; Hidaka, M.; Takamura, N.; Yamasaki, K.; Iwakiri, T.; Okumura, M.; Kodama, H.; Yamaguchi, M.; Ikenoue, T. and Arimori, K. (2003) *Biol. Pharm. Bull.*, **26**(9), 1371-1373.
- [100] Voorman, R.L.; Payne, N.A.; Wienkers, L.C.; Hauer, M.J. and Sanders, P.E. (2001) *Drug Metab. Dispos.*, **29**(1), 41-47.
- [101] Voorman, R.L.; Maio, S.M.; Payne, N.A.; Zhao, Z.; Koeplinger, K.A. and Wang, X. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**(1), 381-388.
- [102] Masubuchi, Y.; Ose, A. and Horie, T. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, **30**(10), 1143-1148.
- [103] Luo, G.; Lin, J.; Fiske, W.D.; Dai, R.; Yang, T.J.; Kim, S.; Sinz, M.; LeCluyse, E.; Solon, E.; Brennan, J.M.; Benedek, I.H.; Jolley, S.; Gilbert, D.; Wang, L.; Lee, F.W. and Gan, L.S. (2003) *Drug Metab. Dispos.*, **31**(9), 1170-1175.
- [104] Kanamitsu, S.; Ito, K.; Green, C.E.; Tyson, C.A.; Shimada, N. and Sugiyama, Y. (2000) *Pharm. Res.*, **17**(4), 419-426.
- [105] Yamazaki, H. and Shimada, T. (1998) *Drug Metab. Dispos.*, **26**(11), 1053-1057.
- [106] Chatterjee, P. and Franklin, M.R. (2003) *Drug Metab. Dispos.*, **31**(11), 1391-1397.
- [107] Hanioka, N.; Ozawa, S.; Jinno, H.; Tanaka-Kagawa, T.; Nishimura, T.; Ando, M. and Sawada, J.I. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, **30**(4), 391-396.
- [108] Wen, X.; Wang, J.S.; Neuvonen, P.J. and Backman, J.T. (2002) *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **57**(11), 799-804.
- [109] Jang, G.R. and Benet, L.Z. (1997) *J. Pharmacokinetic. Biopharm.*, **25**(6), 647-672.
- [110] Iwata, H.; Tezuka, Y.; Kadota, S.; Hiratsuka, A. and Watabe, T. (2005) *Drug Metab. Pharmacokinetic.*, **20**(1), 34-45.
- [111] Weemhoff, J.L.; von Moltke, L.L.; Richert, C.; Hesse, L.M.; Harmatz, J.S. and Greenblatt, D.J. (2003) *J. Pharm. Pharmacol.*, **55**(3), 381-386.
- [112] Desta, Z.; Wu, G.M.; Moroch, A.M. and Flockhart, D.A. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, **30**(3), 336-342.
- [113] Boek-Dohalska, L.; Hodek, P.; Sulc, M. and Stiborova, M. (2001) *Chem. Biol. Int.*, **138**(1), 85-106.
- [114] Kalgutkar, A.S.; Vaz, A.D.N.; Lame, M.E.; Henne, K.R.; Soglia, J.; Zhao, S.X.; Abramov, Y.A.; Lombardo, F.; Collin, C.; Hendsch, Z.S. and Hop, C.E.C.A. (2005) *Drug Metab. Dispos.*, **33**(2), 243-253.
- [115] Denton, T.T.; Zhang, X. and Cashman, J.R. (2004) *Biochem. Pharmacol.*, **67**(4), 751-756.
- [116] Stupans, I.; Murray, M.; Kirlich, A.; Tuck, K.L. and Hayball, P.J. (2001) *Food Chem. Toxicol.*, **39**(11), 1119-1124.
- [117] Harleton, E.; Webster, M.; Bumpus, N.N.; Kent, U.M.; Rae, J.M. and Hollenberg, P.F. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**(3), 1011-1019.
- [118] Richter, T.; Schwab, M.; Eichelbaum, M. and Zanger, U.M. (2005) *Biochem. Pharmacol.*, **69**(3), 517-524.
- [119] Chen, Q.; Ngui, J.S.; Doss, G.A.; Wang, R.W.; Cai, X.; DiNinno, F.P.; Blizzard, T.A.; Hammond, M.L.; Stearns, R.A.; Evans, D.C.; Baillie, T.A. and Tang, W. (2002) *Chem. Res. Toxicol.*, **15**(7), 907-914.
- [120] Soohoo, D.; Van Natta, K. and Carlson, T.J. (1999) *ISSX Proceedings*, **15**, 66.
- [121] Palamanda, J.R.; Casciano, C.N.; Norton, L.A.; Clement, R.P.; Favreau, L.V.; Lin, C. and Nomeir, A.A. (2001) *Drug Metab. Dispos.*, **29**(6), 863-867.
- [122] Sridar, C.; Goosen, T.C.; Kent, U.M.; Williams, J.A. and Hollenberg, P.F. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, **32**(6), 587-594.
- [123] Ring, B.J.; Patterson, B.E.; Mitchell, M.I.; Vandenbranden, M.; Gillespie, J.; Bedding, A.W.; Jewell, H.; Payne, C.D.; Forgue, S.T.; Eckstein, J.; Wrighton, S.A. and Phillips, D.L. (2005) *Clin. Pharmacol. Ther.*, **77**(1), 63-75.
- [124] Wen, X.; Wang, J.S.; Kivisto, K.T.; Neuvonen, P.J. and Backman, J.T. (2001) *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **52**(5), 547-553.
- [125] Lesigiarska, I.; Pajeva, I. and Yanev, S. (2002) *Xenobiotica*, **32**(12), 1063-1077.
- [126] Ravindranath, V.; McMenamin, M.G.; Dees, J.H. and Boyd, M.R. (1986) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **85**(1), 78-91.
- [127] Gravot, A.; Larbat, R.; Hehn, A.; Lievre, K.; Gontier, E.; Goergen, J.L. and Bourgaud, F. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **422**(1), 71-80.
- [128] Blobaum, A.L.; Kent, U.M.; Alworth, W.L. and Hollenberg, P.F. (2002) *Chem. Res. Toxicol.*, **15**(12), 1561-1571.
- [129] Blobaum, A.L.; Harris, D.L. and Hollenberg, P.F. (2005) *Biochemistry*, **44**(10), 3831-3844.
- [130] Beebe, L.E.; Roberts, E.S.; Fornwald, L.W.; Hollenberg, P.F. and Alworth, W.L. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**(10), 1507-1513.
- [131] Sharma, U.; Roberts, E.S. and Hollenberg, P.F. (1996) *Drug Metab. Dispos.*, **24**(6), 669-675.
- [132] Regal, K.A.; Schrag, M.L.; Kent, U.M.; Wienkers, L.C. and Hollenberg, P.F. (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, **13**(4), 262-270.
- [133] Ortiz de Montellano, P. and Reich, N. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**(7), 4136-4141.
- [134] Ortiz de Montellano, P.R.; Beilan, H.S. and Mathews, J.M. (1982) *J. Med. Chem.*, **25**(10), 1174-1179.
- [135] Woodcroft, K.J.; Webb, C.D.; Yao, M.; Weedon, A.C. and Bend, J.R. (1997) *Chem. Res. Toxicol.*, **10**(5), 589-599.
- [136] Helvig, C.; Alayrac, C.; Mioskowski, C.; Koop, D.; Poullain, D.; Durst, F. and Salaun, J.P. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**(1), 414-421.
- [137] Muerhoff, A.S.; Williams, D.E.; Reich, N.O.; CaJacob, C.A.; Ortiz de Montellano, P.R. and Masters, B.S. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**(2), 749-756.
- [138] Reilly, P.E.; Gomi, R.J. and Mason, S.R. (1999) *Chem. Biol. Int.*, **118**(1), 39-49.
- [139] Roberts, E.S.; Hopkins, N.E.; Alworth, W.L. and Hollenberg, P.F. (1993) *Chem. Res. Toxicol.*, **6**(4), 470-479.
- [140] Osawa, Y. and Pohl, L.R. (1989) *Chem. Res. Toxicol.*, **2**(3), 131-141.
- [141] Roberts, E.S.; Hopkins, N.E.; Zaluzec, E.J.; Gage, D.A.; Alworth, W.L. and Hollenberg, P.F. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **323**(2), 295-302.
- [142] Dyck, L.E. and Davis, B.A. (2001) *Drug Metab. Dispos.*, **29**(8), 1156-1161.
- [143] von Weymarn, L.B.; Blobaum, A.L. and Hollenberg, P.F. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **425**(1), 95-105.
- [144] Brady, J.F.; Ishizaki, H.; Fukuto, J.M.; Lin, M.C.; Fadel, A.; Gapac, J.M. and Yang, C.S. (1991) *Chem. Res. Toxicol.*, **4**(6), 642-647.
- [145] Jin, L. and Baillie, T.A. (1997) *Chem. Res. Toxicol.*, **10**(3), 318-327.
- [146] Stearns, R.A. and Ortiz de Montellano, P.R. (1985) *J. Am. Chem. Soc.*, **107**(1), 234-240.
- [147] Defaye, G.; Piffeteau, A.; Delorme, C. and Marquet, A. (1996) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **57**(1-2), 141-147.
- [148] Lunetta, J.M.; Sugiyama, K. and Correia, M.A. (1989) *Mol. Pharmacol.*, **35**(1), 10-17.
- [149] He, K.; Falick, A.M.; Chen, B.; Nilsson, F. and Correia, M.A. (1996) *Chem. Res. Toxicol.*, **9**(3), 614-622.
- [150] Zweers-Zeilmaker, W.M.; Van Miert, A.S.; Horbach, G.J. and Witkamp, R.F. (1998) *Res. Vet. Sci.*, **66**(1), 51-55.
- [151] Ferrero, J.L.; Thomas, S.B.; Marsh, K.C.; Rodrigues, A.D.; Uchic, J.T. and Buko, A.M. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, **30**(10), 1094-1101.
- [152] Sinal, C.J.; Hirst, M.; Webb, C.D. and Bend, J.R. (1998) *Drug Metab. Dispos.*, **26**(7), 681-688.
- [153] Lu, P.; Singh, S.B.; Carr, B.A.; Fang, Y.; Dong Xiang, C.; Rushmore, T.H.; Rodrigues, D.A. and Shou, M. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **313**(2), 518-528.

- [154] Bondon, A.; Macdonald, T.L.; Harris, T.M. and Guengerich, F.P. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**(4), 1988-1997.
- [155] Guengerich, F.P.; Willard, R.J.; Shea, J.P.; Richards, L.E. and Macdonald, T.L. (1984) *J. Am. Chem. Soc.*, **106**(21), 6446-6447.
- [156] Murray, M. and Murray, K. (2003) *Xenobiotica*, **33**(10), 973-987.
- [157] Kuemmerle, S.C.; Shen, T. and Hollenberg, P.F. (1994) *Drug Metab. Dispos.*, **22**(3), 343-351.
- [158] Murray, M. (1992) *Mol. Pharmacol.*, **42**(5), 931-938.
- [159] Sharma, U.; Roberts, E.S.; Kent, U.M.; Owens, S.M. and Hollenberg, P.F. (1997) *Drug Metab. Dispos.*, **25**(2), 243-250.
- [160] Lehman-McKeeman, L.D.; Johnson, D.R.; Caudill, D. and Stuard, S.B. (1997) *Drug Metab. Dispos.*, **25**(3), 384-389.
- [161] Halpert, J.; Jaw, J.Y.; Balfour, C. and Kaminsky, L.S. (1990) *Drug Metab. Dispos.*, **18**(2), 168-174.
- [162] Miller, N.E. and Halpert, J.R. (1987) *Drug Metab. Dispos.*, **15**(6), 846-851.
- [163] Bornheim, L.M.; Everhart, E.T.; Li, J. and Correia, M.A. (1993) *Biochem. Pharmacol.*, **45**(6), 1323-1331.
- [164] Bornheim, L.M. and Grillo, M.P. (1998) *Chem. Res. Toxicol.*, **11**(10), 1209-1216.
- [165] Halpert, J. (1982) *Mol. Pharmacol.*, **21**(1), 166-172.
- [166] Kraner, J.C.; Morgan, E.T. and Halpert, J.R. (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**(3), 1367-1372.
- [167] Warren, J.T.; Rybczynski, R. and Gilbert, L.I. (1995) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25**(6), 679-695.
- [168] Raj, H.G.; Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Goel, S.; Singh, A.; Gupta, K.; Rohil, V.; Tyagi, Y.K.; Jha, H.N.; Olsen, C.E. and Wengel, J. (1998) *Bioorg. Med. Chem.*, **6**(10), 1895-1904.
- [169] Kohli, E.; Raj, H.G.; Kumari, R.; Rohil, V.; Kaushik, N.K.; Prasad, A.K. and Parmar, V.S. (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**(18), 2579-2582.
- [170] Masubuchi, Y. and Horie, T. (1998) *Drug Metab. Dispos.*, **26**(4), 338-342.
- [171] Igwe, O.J.; Hee, S.S. and Wagner, W.D. (1986) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **86**(2), 286-297.
- [172] Satoh, H.; Gillette, J.R.; Davies, H.W.; Schulick, R.D. and Pohl, L.R. (1985) *Mol. Pharmacol.*, **28**(5), 468-474.
- [173] Goosen, T.C.; Kent, U.M.; Brand, L. and Hollenberg, P.F. (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, **13**(12), 1349-1359.
- [174] Kent, U.M.; Roberts, E.S.; Chun, J.; Hodge, K.; Juncaj, J. and Hollenberg, P.F. (1998) *Chem. Res. Toxicol.*, **11**(10), 1154-1161.
- [175] Babu, B.R. and Vaz, A.D. (1997) *Biochemistry*, **36**(23), 7209-7216.
- [176] Roberts, E.S.; Lin, H.; Crowley, J.R.; Vuletich, J.L.; Osawa, Y. and Hollenberg, P.F. (1998) *Chem. Res. Toxicol.*, **11**(9), 1067-1074.
- [177] Decker, C.; Sugiyama, K.; Underwood, M. and Correia, M.A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **136**(3), 1162-1169.
- [178] Decker, C.J.; Rashed, M.S.; Baillie, T.A.; Maltby, D. and Correia, M.A. (1989) *Biochemistry*, **28**(12), 5128-5136.
- [179] Miao, E.; Joardar, S.; Zuo, C.; Cloutier, N.J.; Nagahisa, A.; Byon, C.; Wilson, S.R. and Orme-Johnson, W.H. (1995) *Biochemistry*, **34**(26), 8415-8421.
- [180] Watson, D.E.; Menard, L.; Stegeman, J.J. and Di Giulio, R.T. (1995) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **135**(2), 208-215.
- [181] Chang, T.; Levine, M.; Bandiera, S.M. and Bellward, G.D. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**(3), 1441-1449.
- [182] Yao, K.; Falick, A.M.; Patel, N. and Correia, M.A. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**(1), 59-65.
- [183] Vaccaro, E.; Giorgi, M.; Longo, V.; Mengozz, I.G. and Gervasi, P.G. (2003) *Aquat. Toxicol.*, **62**(1), 27-33.
- [184] Yu, L.-S.; Yao, T.-W. and Zeng, S. (2003) *Chem. Biol. Int.*, **146**(3), 263-272.
- [185] Ohnishi, N.; Kusuhara, M.; Yoshioka, M.; Kuroda, K.; Soga, A.; Nishikawa, F.; Koishi, T.; Nakagawa, M.; Hori, S.; Matsumoto, T.; Yamashita, M.; Ohta, S.; Takara, K. and Yokoyama, T. (2003) *Biol. Pharm. Bull.*, **26**(9), 1315-1320.
- [186] Kent, U.M.; Aviram, M.; Rosenblatt, M. and Hollenberg, P.F. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, **30**(6), 709-715.
- [187] Masubuchi, Y.; Masuda, E. and Horie, T. (2002) *Gastroenterology*, **122**(3), 774-783.
- [188] Lin, L.Y.; Fujimoto, M.; Distefano, E.W.; Schmitz, D.A.; Jayasinghe, A. and Cho, A.K. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**(2), 595-603.
- [189] Minamiyama, Y.; Takemura, S.; Imaoka, S.; Funae, Y.; Tanimoto, Y. and Inoue, M. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**(3), 1479-1485.
- [190] Masubuchi, Y.; Narimatsu, S.; Hosokawa, S. and Suzuki, T. (1994) *Biochem. Pharmacol.*, **48**(10), 1891-1898.
- [191] Underwood, M.C.; Cashman, J.R. and Correia, M.A. (1992) *Chem. Res. Toxicol.*, **5**(1), 42-53.
- [192] Yanev, S.; Kent, U.M.; Pandova, B. and Hollenberg, P.F. (1999) *Drug Metab. Dispos.*, **27**(5), 600-604

3. Nouvelle méthode pour détecter la TDI

3. Nouvelle Méthode pour Détecter l'Inhibition Dépendante du Temps (Time-Dependent Inhibition ou TDI)

3.1 Introduction

L'importance de la détermination de l'inhibition et de l'inhibition dépendante du temps (TDI) sur les cytochromes P450 par les composés qui ont un potentiel comme nouveaux agents thérapeutiques a été soulignée antérieurement. La détermination de l'efficacité des nouvelles molécules comme inhibiteurs des cytochromes P450 est importante pour éviter de développer de nouveaux médicaments qui risquent de provoquer des interactions médicamenteuses chez les patients.

Dans les années '90 le développement de la chimie combinatoire et des tests à haut débit (« high throughput ») pour déterminer l'activité pharmacologique des nouveaux composés, a provoqué une augmentation massive du nombre des molécules candidates comme agents thérapeutiques potentiels pour l'homme. Ce changement d'échelle dans la recherche pharmaceutique exigeait aussi la disponibilité d'un test rapide et efficace pour déterminer l'inhibition des cytochromes P450 et donc leur potentiel à donner des interactions médicamenteuses.

Des tests utilisant des microplaques et la mesure de la fluorescence d'un produit de réaction des cytochromes P450, ont été proposés dans les années '90 pour le CYP2B1 (Donato, 1993) et le CYP1A (Kennedy, 1994). Ces deux premiers exemples de tests pour mesurer l'activité des cytochromes P450 à travers la mesure de la fluorescence ont été appliqués aux microsomes ou aux hépatocytes entiers, mais c'est seulement quelques années plus tard que le principe de la lecture de fluorescence en microplaque a été utilisé sur les cytochromes P450 recombinants (Supersomes : membranes de cellules d'insecte infectées par Baculovirus et exprimant une seule isoforme de cytochrome P450). La description d'un test d'inhibition des cytochromes P450 à haut débit « high throughput test » adapté à plusieurs isoformes (CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2D6) impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques *in vivo* chez l'homme, a été publiée par Crespi en 1997.

Le test d'inhibition des différentes isoformes de cytochromes P450 utilisé dans ce travail de thèse est basé sur le test mis au point et développé par Crespi (Crespi, 2000), légèrement modifié. Le même principe a été aussi employé pour le développement des deux tests pour la

détermination de l'inhibition dépendante du temps (TDI) : l'un avec différents temps de pré-incubation, l'autre en suivant la cinétique d'inactivation.

3.2 Méthodes fluorimétriques de détermination de l'IC₅₀

3.2.a Description de la méthode publiée par Crespi

La méthode pour la détermination de l'IC₅₀, comme est-elle décrite dans la publication originelle (Crespi, 1997), est réalisée dans une microplaque à 96 puits (Corning Costar, Cambridge, MA). Les substrats des cytochromes P450 utilisés sont la résorufine benzyl éther (BzRes), pour le CYP3A4, et la 3-cyano-7-ethoxy coumarine (CEC), pour les CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 et CYP2C19. Ces substrats ne sont pas fluorescents, ou leur spectre de fluorescence est suffisamment décalé par rapport à celui de leurs produits de métabolisation par les cytochromes P450, qui sont fluorescents et peuvent être quantifiés par fluorimétrie. Les substrats sont utilisés en suspension dans des tampons phosphates à pH de 7.4. Les 12 puits de chaque ligne de la plaque sont employés pour construire la courbe d'inhibition d'une seule molécule. Les inhibiteurs sont utilisés à 8 concentrations, obtenues par dilutions successives 1 : 3, les puits restants sont remplis par le contrôle (en absence d'inhibiteur ; 100% d'activité enzymatique) et le blanc (en absence d'inhibiteur et de substrat ; 0% d'activité enzymatique).

Après des temps d'incubation différents pour chaque isoforme (de 30 à 45 minutes), la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 100 µL d'un mélange d'acétonitrile et tampon Tris à pH 9 et l'activité résiduelle du cytochrome P450 est quantifiée par fluorimétrie. On mesure la quantité du métabolite fluorescent produit pendant l'incubation en présence d'inhibiteur.

L'analyse des données est effectuée par interpolation linéaire des vitesses de réaction à différentes concentrations d'inhibiteur en fonction des concentrations (pente vs. concentration) pour calculer la valeur de l'IC₅₀ de l'inhibiteur analysé.

Cette méthode de détermination de l'IC₅₀ par fluorimétrie a été ultérieurement développée par la même équipe de travail afin d'améliorer le rapport signal / bruit de fond lors de la mesure de fluorescence des produits du métabolisme des cytochromes P450 (Crespi, 2000). Des nouvelles conditions expérimentales ont été définies. Les variations principales par rapport à la première version du test sont : le développement et l'utilisation de nouveaux substrats fluorescents pour les différentes isoformes, avec différents temps d'incubation ; la diminution des concentrations des cytochromes P450 dans les mélanges d'incubation (grâce à l'addition du cytochrome *b₅* dans les préparations de cytochromes P450 recombinants) ; l'utilisation du tampon phosphate à pH 7.4 à différentes concentrations pour les différentes isoformes. Les substrats sont utilisés à des

concentrations proches de la valeur de la K_m de chaque produit ; pour la BFC (substrat du CYP3A4) ce n'est pas possible, car la K_m de ce substrat a une valeur supérieure à la limite de solubilité de la BFC en tampon, donc la concentration d'utilisation est au dessous de la valeur de K_m .

Les paramètres rapportés dans la publication et utilisés pour l'exécution expérimentale du test sont présentés en table 3.1.

Ces nouvelles méthodes basées sur la mesure de la fluorescence permettent de mesurer l' IC_{50} de façon beaucoup plus rapide et plus simple que la méthode traditionnelle, qui utilise les microsomes de foie humain incubés avec des substrats spécifiques pour chaque isoforme (en présence d'inhibiteur), et qui nécessite une puissance analytique considérable pour la quantification de métabolites. En plus, elle permet la mesure avec des quantités de réactifs nettement plus basses que l'ancien test, car elle est réalisée dans une microplaque avec un volume total d'incubation de 200 μ L et qui peut être encore miniaturisée (plaque à 384 trous, volume final 40 μ L).

Enzyme	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4*
Substrate	CEC	MFC	CEC	AMMC	BFC
Phosphate buffer concentration (mM)	100	25	50	100	200
Substrate concentration for IC_{50} (μ M)	5	25	25	50	50
Incubation time (min)	20	45	30	45	30
pmol enzyme per well	0.5	1	1	1.5	1
Incubation time (min)	30	45	45	45	30

Table 3.1 : Paramètres cinétiques des couples enzyme/substrat et paramètres pour l'exécution du test d'inhibition des cytochromes P450 (Crespi, 2000).

* Des autres substrats ont aussi été proposés pour le CYP3A4 : la BzRes (résorufine benzyl éther), la BQ (quinoline 7-benzyl éther) et la DBF (dibenzyl fluorescéine).

3.2.b Méthode pour la détermination de l' IC_{50} utilisé dans cette thèse

Le principe de la méthode de Crespi pour la détermination de l' IC_{50} a été utilisé aussi pour la mise au point de la méthode de ce travail de thèse.

Les principales modifications de la méthode de Crespi (Crespi, 2000) apportées dans ce laboratoire concernent les solvants utilisés et le fait que la mesure de la fluorescence n'est pas

faite en mesure unique (end-point measurement), quand la réaction entre cytochrome P450 et son substrat spécifique (en présence d'inhibiteur) a été déjà arrêtée, mais en mode cinétique (kinetic measurement), du début à la fin de la réaction enzymatique.

Les substrats spécifiques utilisés pour les différents isozymes sont les suivantes : BFC pour le CYP3A4 ; CEC pour le CYP1A2 et CYP2C19; AMMC pour le CYP2D6 ; MFC pour le CYP2C9. Tous les détails expérimentaux pour la réalisation du test sont décrits dans la partie expérimentale (section 7.2). Une comparaison entre les schémas généraux de la méthode fluorimétrique originale et celle modifiée utilisée dans cette thèse est présentée en figure 3.1.

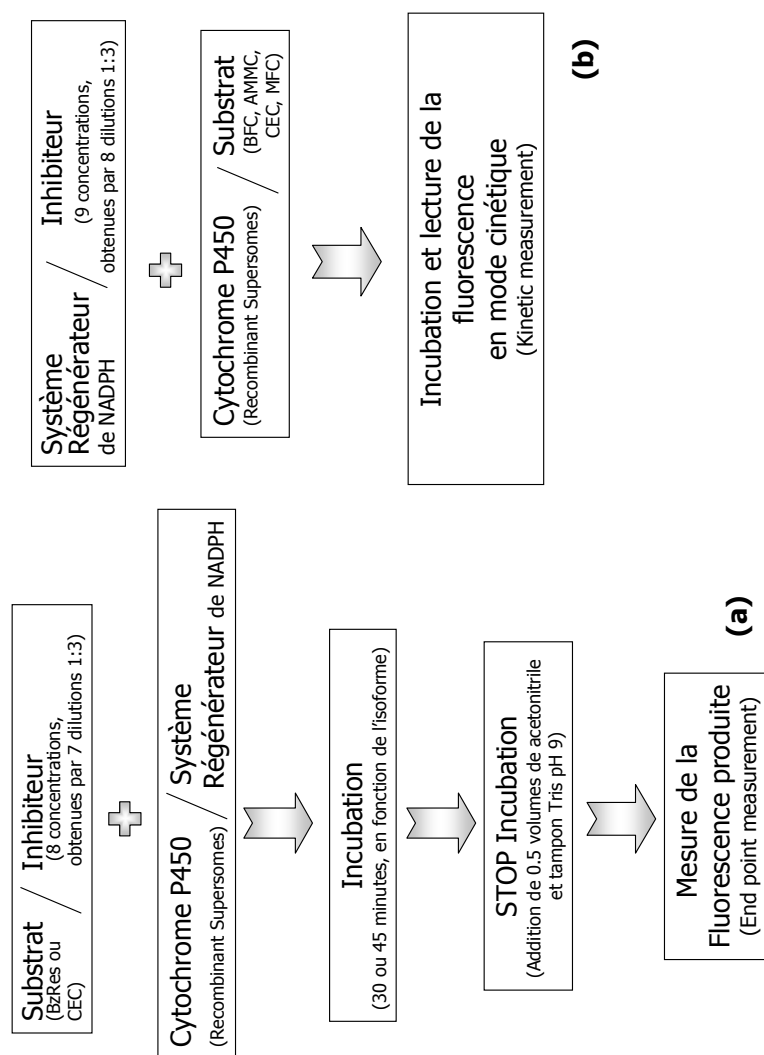


Figure 3.1 : Schémas généraux des méthodes de détermination d' IC₅₀. (a) Test publié par Crespi (1997), avec la mesure de la fluorescence après arrêt de la réaction enzymatique du cytochrome P450. (b) Test modifié utilisé dans notre laboratoire, avec la mesure de la fluorescence en mode cinétique continu.

Dans la description originale du test (Crespi, 1997), les substrats sont utilisés en suspension dans le tampon phosphate, les contrôles positifs en solution dans le méthanol ou dans l'eau. Et dans la description successive de la méthode (Crespi, 2000) les substrats sont utilisés en solution dans l'acétonitrile. Par contre, dans cette thèse, toutes les substrats et contrôles positifs utilisés pour le test de détermination de l'IC₅₀ sont employés en solution dans le DMSO, à concentrations telles que la concentration finale de DMSO dans le mélange d'incubation soit constante dans tous les puits et égale à 0.5 % v/v. Le DMSO est un solvant capable d'inhiber les cytochromes P450 (Busby, 1999). Pourtant, on l'a utilisé comme solvant dans la mise au point de ce test à cause de son intérêt industriel : c'est le solvant communément utilisé pour les solutions des molécules en développement (chez Roche).

La modification principale effectuée sur le test original concerne la mesure de la fluorescence. Au lieu de mesurer la fluorescence en fin de réaction enzymatique, après une période d'incubation (cytochrome P450, inhibiteur et substrat), on mesure l'augmentation de la fluorescence pendant le temps de co-incubation, en mode cinétique. La pente de la courbe (intensité de la fluorescence produite vs. temps), qui représente la vitesse de la réaction de formation des métabolites fluorescentes, n'est pas calculée sur une ligne tracée entre deux points, comme il advient quand on a une seule mesure de fluorescence (end point), mais sur une courbe d'interpolation des données de fluorescence mesurées au cours du temps d'incubation du cytochrome P450 et son substrat spécifique (mesure cinétique) (figure 3.2). On calcule les pentes des courbes d'interpolation aux différentes concentrations d'inhibiteur (après soustraction des valeurs de fluorescence du blanc) et l'exprime comme pourcentage de l'activité du contrôle (sans inhibiteur) : par différence on calcule le pourcentage d'inhibition (inhibition %) et on porte ces valeurs d'inhibition en fonction des concentrations, en échelle logarithmique, pour le calcul de l'IC₅₀. Les données sont ajustées dans l'équation représentative de la courbe dose-réponse :

$$y = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{C}{x}\right)^D} \quad (\text{Équation 3.1})$$

où y est le pourcentage d'inhibition en présence d'une concentration d'inhibiteur (x) définie ; A , B , C et D sont les paramètres qui sont optimisés dans l'ajustement des données dans l'équation. En particulier, le paramètre C correspond à la valeur de l'IC₅₀ (quand D est égale à 1). Le calcul de l'IC₅₀ est effectué par optimisation des paramètres dans l'équation 3.1 et elle correspond à la concentration d'inhibiteur qui produit 50% d'inhibition sur la courbe.

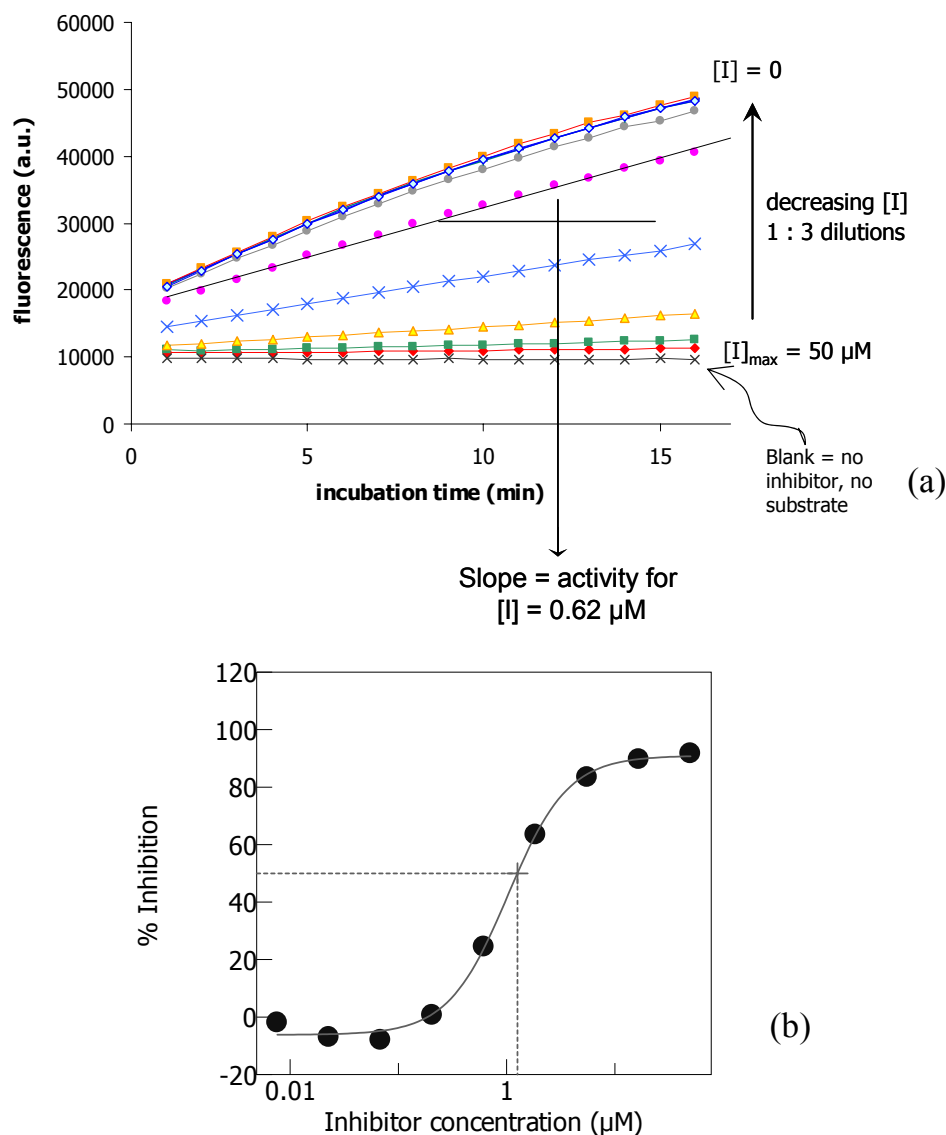


Figure 3.2 : graphiques représentatifs des calculs de l' IC_{50} à partir des données de fluorescence obtenues avec le test de Crespi modifié. L'image ci-dessus correspond à une seule plaque. (a) Mesure de la fluorescence du produit de la métabolisation de la BFC par le CYP3A4, mesurée à λ_{ex} 420 et λ_{em} 520 nm pendant 16 minutes en présence d'inhibiteur à différentes concentrations. Pour chaque concentration d'inhibiteur, la pente de la tangente à la courbe de fluorescence en fonction du temps représente la vitesse de la réaction du cytochrome P450. L'activité du blanc est soustraite de cette valeur, et l'activité est exprimée comme le pourcentage de l'activité du CYP3A4 en absence d'inhibiteur. Par différence, on obtient le pourcentage d'inhibition. (b) Le pourcentage d'inhibition est porté sur le graphique en fonction du logarithme de la concentration d'inhibiteur, les données sont ajustées dans l'équation dose-réponse et la concentration d'inhibiteur qui donne le 50% d'inhibition représente l' IC_{50} .

3.2.c Validation de le méthode de détermination de l'IC₅₀ et statistiques

La procédure de détermination de l'IC₅₀ modifiée a été validée avec des inhibiteurs bien connus des différentes isoformes de cytochromes P450 : le kétoconazole (CYP3A4), le sulphaphénazole (CYP2C9), la quinidine (CYP2D6), la furafylline (CYP1A2) et la tranylcypromine (CYP2C19). Les valeurs d'IC₅₀ obtenus sont en accord avec les données publiées par Crespi (1997) (table 3.2). Dans la littérature, on trouve parfois des valeurs d'IC₅₀ parfois notablement différentes pour le même inhibiteur. Les différences dépendent des conditions utilisées pour les mesurer et des substrats des cytochromes P450 considérés. Par exemple, pour le kétoconazole (inhibiteur du CYP3A4), on peut trouver des valeurs d'IC₅₀ distribuées dans un ample intervalle de valeurs : de 3 µM (Haener, 2004), à 2 µM (Back, 1989), 1.57 µM (Halliday, 1995), 0.55 ± 0.12 µM (Eagling, 1999). 0.19-0.22 µM (Baldwin, 1995), 0.038-0.049 µM (Perloff, 2000), jusqu'à 0.01 µM (Weaver, 2003). On retrouve des grandes différences entre les données d'auteurs différents aussi pour les inhibiteurs d'autres isoformes de cytochromes P450 (furafylline, sulphaphénazole, tranylcypromine et quinidine).

Le test décrit en section 3.2.b est utilisé dans notre laboratoire depuis plusieurs années, pour la détermination de l'IC₅₀ des composés en développement. Les inhibiteurs utilisés pour la validation du test pour les différentes isoformes sont aussi utilisés comme contrôles positifs quand le test est utilisé pour la mesure de l'IC₅₀ de composés inconnus. On a donc une grande quantité de données, accumulées pendant une période assez longue, qui peuvent être utilisés pour évaluer la variabilité des résultats de la méthode. En table 3.2 on rapporte les résultats de la variabilité des valeurs de l'IC₅₀ des contrôles positifs pour des tests effectués à des dates différentes pendant une période de six mois. La reproductibilité des résultats est bonne, avec une variabilité (erreur standard) en dessous de 10%.

Isoform	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Inhibitor	Furafylline	Sulphaphenazole	Tranilcypromine	Quinidine	Ketoconazole
n=	37	32	35	34	32
IC ₅₀ (max) - μ M	8.5	0.80	9.6	0.012	0.073
IC ₅₀ (min) - μ M	1.3	0.05	1.5	0.004	0.010
IC₅₀ (average) - μM	2.6	0.31	5.6	0.007	0.053
SEM	0.2	0.03	0.3	0.0004	0.003
Crespi (1997) IC ₅₀ - μ M	0.67 \pm 0.080	0.230 \pm 0.010	5.8 \pm 0.200	0.0089 \pm 0.0016	0.083 \pm 0.025

Table 3.2 : Variabilité des résultats des contrôles de la méthode de détermination de l'IC₅₀ dans des tests effectués à des dates différentes pendant une période de six mois. Comparaison avec les résultats de littérature (moyenne \pm erreur standard, pour n=3), obtenus avec la méthode originale publiée par Crespi (1997).

Dans une expérience ultérieure, on a aussi évalué la variabilité des résultats de la méthode de détermination de l'IC₅₀ pour des tests effectués dans la même journée (intra-experiment variability) et à des dates différentes (inter-experiment variability). Les tests ont été réalisés en triplicat dans une seule journée, pendant trois jours consécutifs.

L'évaluation a intéressé les trois principales isoformes de cytochromes P450 hépatiques (CYP3A4, CYP2C9 et CYP2D6), et on a employé plusieurs composés avec des puissances d'inhibition très diverses. Les composés ont été choisis parmi les inhibiteurs de chaque isoforme, mais on a inclus dans la liste aussi des composés non inhibiteurs. La variété des structures chimiques dans les groupes de composés à tester était un point important et pour la garantir on a choisi des molécules chimiquement diverses et on a évité d'utiliser des séries de composés homologues. Les résultats de cette étude pour chaque isoforme sont résumés dans les tables 3.3, 3.4 et 3.5.

Les IC₅₀ des contrôles ont les valeurs attendues, et les déterminations des IC₅₀ sur les autres composés sont bien reproductibles.

	experiment 1				experiment 2				experiment 3			
	n1	n2	n3	mean	n1	n2	n3	mean	n1	n2	n3	mean
Ketoconazole	0.041	0.045	0.034	0.040	0.029	0.046	0.046	0.040	0.042	0.038	0.039	0.040
Astemizole	3.6	2.5	2.3	2.8	3.4	2.4	2.5	2.8	4.2	2.8	2.7	3.2
Carbamazepine	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Cisapride	0.35	0.27	0.33	0.32	0.37	0.34	0.28	0.33	0.41	0.31	0.35	0.36
Clotrimazole	0.022	0.020	0.015	0.019	0.018	0.019	0.023	0.020	0.017	0.016	0.018	0.017
Cyclosporin A	8.3	6.0	5.7	6.7	8.3	7.0	5.3	6.9	6.3	5.4	6.3	6.0
Diltiazem	37	45	34	39	39	36	45	40	31	34	43	36
Erythromycin	40	31	32	34	42	30	37	36	38	27	34	33
Ketoconazole	0.032	0.042	0.042	0.039	0.041	0.04	0.044	0.042	0.029	0.037	0.044	0.037
Ethynylestradiol	2.2	1.1	5.6	3.0	0.6	6.9	9.6	5.7	1.9	8.2	1.3	3.8
Felodipine	1.9	2.1	1.5	1.8	1.8	1.6	1.7	1.7	1.5	1.4	1.6	1.5
Itraconazole	0.8	0.81	0.77	0.79	0.62	0.63	0.76	0.67	0.55	0.49	0.63	0.56
Ketoconazole	0.044	0.051	0.046	0.047	0.050	0.045	0.043	0.046	0.038	0.039	0.046	0.041
Mibefradil	0.15	0.09	0.11	0.12	0.15	0.13	0.12	0.13	0.17	0.13	0.14	0.15
Miconazole	0.15	0.18	0.22	0.18	0.23	0.19	0.19	0.20	0.13	0.15	0.17	0.15
Midazolam	6.1	7.7	7.7	7.2	6.2	6.4	9.1	7.2	11.7	10.6	7.8	10.0
Ketoconazole	0.038	0.036	0.042	0.039	0.035	0.031	0.047	0.038	0.043	0.045	0.035	0.041
Niccardipine	0.37	0.41	0.44	0.41	0.48	0.39	0.47	0.45	0.38	0.48	0.39	0.42
Nifedipine	3.2	4.8	4.0	4.0	4.2	4.7	4.7	4.5	4.2	4.3	4.4	4.3
Omeprazole	9.3	10.0	6.4	8.6	7.7	10.1	9.4	9.1	13	10.1	12	11.7
Progesterone	act	act	act	act	>50	act	>50	>50	act	act	act	act
Quinidine	>50	>50	37	>50	>50	>50	45	>50	49	49.6	>50	>50
Ranitidine	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Ritonavir	0.037	0.032	0.024	0.031	0.029	0.034	0.032	0.032	0.037	0.033	0.031	0.034
Ketoconazole	0.039	0.04	0.044	0.041	0.037	0.039	0.034	0.037	0.036	0.036	0.035	0.036
Saquinavir	1.4	1.4	1.4	1.4	1.9	1.6	1.6	1.7	1.5	1.5	1.5	1.5
Testosterone	act	act	act	act	act	act	act	act	act	act	act	act
Troleandomycin	1.2	1.1	1.3	1.2	1.1	1.5	1.2	1.3	1.2	1.7	1.3	1.4
Tamoxifen	6.6	6.5	6.6	6.6	6.3	7.2	8.7	7.4	7.6	8.2	5.9	7.2
Verapamil	9.6	9.5	7.2	8.8	7.7	11	8.7	9	9.8	11	9.8	10.2

Table 3.3 : Résumé des résultats de l'étude de variabilité du test de détermination de l'IC₅₀ pour le CYP3A4.

La valeur de variabilité la plus haute (erreur standard % sur la valeur moyenne) intra-expérience est de 15% et inter-expérience est de 10%.

	experiment 1				experiment 2				experiment 3			
	n1	n2	n3	mean	n1	n2	n3	mean	n1	n2	n3	mean
Quinidine	0.028	0.03	0.027	0.028	0.032	0.031	0.027	0.030	0.031	0.039	0.034	0.035
Cimetidine	53	59	61	58	56	61	55	57	53	45	34	44
Diltiazem	41	48	41	43	39	51	51	47	37	48	52	46
Imipramine	3.2	2.2	4.0	3.1	3.60	4.0	4.2	3.9	3.3	4.1	3.8	3.7
Metoprolol	20	21	21	21	19	22	22	21	19	23	19	20
Quinidine	0.039	0.042	0.032	0.038	0.041	0.033	0.033	0.036	0.038	0.035	0.03	0.034
Quinidine	0.028	0.029	0.031	0.029	0.027	0.031	0.025	0.028	0.023	0.026	0.03	0.026
Ritonavir	1.6	1.7	1.6	1.6	1.6	1.7	1.9	1.7	1.6	1.8	1.8	1.7
Verapamil	9.6	8.3	8.6	8.8	8.1	11	9.2	9.4	8.5	10	9	9.2
Bufurazol	8.3	8.1	7	7.8	6.2	6.6	6.6	6.5	5.9	7.5	6.9	6.8
Tamoxifen	11.2	10	11	11	9	10	11	10	8.5	10	10	10

Table 3.4 : Résumé des résultats de l'étude de variabilité du test de détermination de l'IC₅₀ pour le CYP2D6.

La valeur de variabilité la plus haute (erreur standard % sur la valeur moyenne) intra-expérience est de 13% et inter-expérience est de 6%.

	experiment 1				experiment 2				experiment 3			
	n1	n2	n3	mean	n1	n2	n3	mean	n1	n2	n3	mean
Sulphaphenazole	0.61	0.70	0.64	0.65	0.71	0.54	0.52	0.59	0.28	0.36	0.37	0.34
Benzbromarone	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023	<0.023
Cisapride	1.4	5.8	5.4	4.2	4.2	3.4	4.5	4.0	4.1	4.7	4.7	4.5
Clotrimazole	0.23	0.35	0.41	0.3	0.40	0.37	0.39	0.39	0.43	0.33	0.43	0.40
Diclofenac	2.8	3.2	2.6	2.9	2.1	1.7	2.1	1.1	1.6	2.4	1.7	1.9
Phenytoin	39	31	31	34	26	30	32	24	19	20	24	21
Fluoxetine	16	16	17	16	12	13	11	19	12	16	13	14
Ibuprofen	47	30	36	38	32	35	50	27	30	28	>50	29
Sulphaphenazole	0.62	0.75	0.62	0.66	0.51	0.31	0.44	1.6	0.38	0.31	0.38	0.36
Ketoconazole	4.8	5.2	4.7	4.9	4.7	3.8	4.7	4.4	4.0	4.4	5.2	4.5
Naproxen	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Phenylbutazone	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Piroxicam	13	19	16	16	17	14	12	14	13	15	9	12
Warfarin	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib	act/inhib
Sulphaphenazole	0.27	0.44	0.39	0.37	0.31	0.18	0.27	0.25	0.28	0.27	0.30	0.28
Sulfinylpyrazone	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Sulphaphenazole	0.21	0.21	0.26	0.23	0.35	0.46	0.36	0.39	0.30	0.15	0.14	0.20
Tenoxicam	12	13	14	13	>50	30	29	30	12	10	13	12
Tolbutamide	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Tolfenaim acid	act	act	act	act	act	act	act	act	act	act	act	act
Tranylcypromine	11	12	12	12	19	17	17	18	17	14	13	15

Table 3.5 : Résumé des résultats de l'étude de variabilité du test de détermination de l'IC₅₀ pour le CYP2C9. La valeur de variabilité la plus haute (erreur standard % sur la valeur moyenne) intra-expérience est de 16% et inter-expérience est de 22%.

3.3 Méthode de détermination de l'inhibition en fonction du temps de pré-incubation.

La méthode de détermination de l'IC₅₀ des inhibiteurs des cytochromes P450 a été adaptée aussi pour la détermination de l'inhibition dépendante du temps de pré-incubation (TDI).

On a maintenu le principe du test, avec la mesure de l'activité des cytochromes P450 à travers de la mesure de la fluorescence des produits des réactions enzymatiques avec les substrats spécifiques, en mode cinétique.

Les conditions générales de l'incubation, comme les substrats spécifiques utilisés, les concentrations des cytochromes P450, du système régénérateur du NADPH, et des substrats spécifiques sont les mêmes déjà utilisées pour le test de détermination de l'IC₅₀ des inhibiteurs réversibles.

Avant de démarrer la réaction entre cytochrome P450 et substrat (en présence de l'inhibiteur) on effectue une phase de pré-incubation, pour permettre la réaction entre le cytochrome P450 et l'inhibiteur dépendant du temps. Pour la pré-incubation, la plaque est préparée avec le système régénérateur de NADPH et l'inhibiteur à différentes concentrations. La sélection des concentrations d'inhibiteurs est effectuée sur la base des valeurs d'IC₅₀ précédemment mesurées.

Normalement, le composé sous analyse est utilisé à deux concentrations : l'une proche de l'IC₅₀, l'autre 5 ou 10 fois la valeur de l'IC₅₀. Tous les détails expérimentaux pour la réalisation du test de détermination de la TDI sont décrits dans la section 7.3.

On démarre la pré-incubation par addition du cytochrome P450 sur la plaque, préparée avec le système régénérateur de NADPH et les composés à tester à différentes concentrations. Le cytochrome P450 est rajouté à des temps successifs dans les lignes de la plaque à 96 puits, afin d'effectuer la pré-incubation à plusieurs (quatre) temps de pré-incubation en duplicat.

Après la dernière addition du cytochrome P450, on démarre immédiatement la réaction entre le cytochrome P450 et son substrat spécifique. On commence aussi au même temps la mesure de la fluorescence émise par le produit de réaction.

Avec ce système, on mesure l'activité catalytique résiduelle des cytochromes P450 après des temps différents de pré-incubation avec l'inhibiteur (0, 10, 15, 20 minutes), en présence de système régénérateur de NADPH. La présence de NADPH dans le mélange de pré-incubation est fondamentale pour permettre la métabolisation du composé sous analyse en métabolite réactif, capable de se lier irréversiblement ou très étroitement au cytochrome P450.

Si on mesure les composés seulement à deux concentrations, cette méthode ne permet pas de calculer les paramètres cinétiques qui décrivent la réaction d'inhibition dépendant du temps. En fait, pour calculer ces paramètres (K_I et k_{inact}) il serait nécessaire de mesurer la même cinétique de pré-incubation à plusieurs concentrations d'inhibiteur (minimum cinq concentrations). Dans les conditions décrites la méthode peut être utilisée comme test semi-quantitatif : on peut définir si le composé sous analyse est un inhibiteur plus fort ou plus faible par rapport à une substance de contrôle, un inhibiteur bien connu pour donner de la TDI, par comparaison de l'activité résiduelle du cytochrome P450 après la pré-incubation.

La méthode a été validée pour trois isoformes de cytochromes P450, le CYP3A4, CYP2C9 et le CYP1A2. Pour chacune de ces isoformes, une substance qui donne une forte TDI a été choisie et utilisée comme référence (comme contrôle).

Les composés utilisés pour la validation de la méthode ont été choisis parmi les substances décrites dans la littérature et incluses dans la table qui accompagne la revue sur les inhibiteurs suicides (Chapitre 2). Le test n'a pas été validé sur les CYP2B6, CYP2C19 et CYP2D6. Cependant, cela pourrait être fait dans l'avenir en utilisant comme contrôles la ticlopidine pour les CYP2B6 et CYP2C19 et la paroxétine pour le CYP2D6.

Les composés utilisés pour la validation du test pour le CYP3A4 sont : troléandomycine, mibéfradil, ritonavir, tamoxifen, diltiazem, érythromycine, 17- α -éthynylestradiol ; les inhibiteurs

spécifiques du CYP2C9 utilisés sont : cimétidine, sulphaphénazole ; les inhibiteurs du CYP1A2 choisis sont : furafylline, méthymazole. Les concentrations des composés dans le mélange de réaction sont calculées à partir des valeurs d'IC₅₀. Les IC₅₀ de toutes les composés et les concentrations pour le test de TDI sur les différentes isoformes de cytochromes P450 sont rapportés dans les tables 3.6, 3.7 et 3.8.

Les composés utilisés comme contrôles positifs, c'est-à-dire connus comme inhibiteurs suicides, pour ce test sont : la troléandomycine (TAO) pour le CYP3A4, la furafylline pour le CYP1A2 et la cimétidine pour le CYP2C9.

Les résultats du test sont évalués en mode graphique :

on porte les valeurs d'activité résiduelle des cytochromes P450 (log % activity) en fonction du temps de pré-incubation (time (min)).

La mesure de fluorescence pour déterminer l'activité résiduelle est effectuée en mode cinétique, comme pour la mesure de l'IC₅₀, sur un temps variable qui dépend de l'isoforme de cytochrome P450 : 16 minutes pour le CYP3A4, 30 minutes pour le CYP2C9 et 20 minutes pour le CYP1A2. La fluorescence est mesurée toutes les minutes pendant cette cinétique. La pente de la tangente à la courbe de fluorescence produite par la réaction enzymatique en fonction du temps, représente l'activité du cytochrome P450. Cette pente est calculée pour les composés à plusieurs concentrations et après différents temps de pré-incubation. Les valeurs de l'activité des cytochromes P450 sont exprimées comme pourcentages de l'activité du contrôle, (en absence d'inhibiteur).

Composés	IC ₅₀ (μM)	Conc 1 (μM)	Conc 2 (μM)
Ritonavir	0.03	0.03	0.3
Mibéfradil	0.13	0.3	1.3
Troléandomycine	1.2	1.0	10
17-α-Éthinylestradiol	4.0	2.0	20
Tamoxifen	7.0	7.0	70
Erythromycine	35	20	100
Diltiazem	40	20	100

Table 3.6 : valeurs d'IC₅₀ et concentrations d'utilisation des composés utilisés pour valider la méthode de détection de la TDI sur le CYP3A4. La mesure de l' IC₅₀ a été réalisée en utilisant la méthode de fluorescence décrite dans la section 3.2.b avec la BFC comme substrat.

Composés	IC ₅₀ (μM)	Conc 1 (μM)		Conc 2 (μM)	
Furafylline	5.1	1.25	2.5	12.5	25
Méthimazole	>50	50		500	

Table 3.7 : valeurs d'IC₅₀ et concentrations des composés pour valider la méthode pour la détection de la TDI sur le CYP1A2. La furafylline a été testée à quatre concentrations, pour souligner l'effet de la concentration sur la TDI. La mesure de l'IC₅₀ a été réalisée en utilisant la méthode de fluorescence décrite dans la section 3.2.b.

Composés	IC ₅₀ (μM)	Conc 1 (μM)	Conc 2 (μM)
Cimétidine	>50	50	250
Méthimazole	>50	50	500

Table 3.8 : valeurs d'IC₅₀ et concentrations d'utilisation des composés pour valider la méthode pour la détection de la TDI sur le CYP2C9. La mesure de l'IC₅₀ a été réalisée en utilisant la méthode de fluorescence décrite dans la section 3.2.b.

Ce pourcentage de l'activité résiduelle est reporté sur un graphique en fonction du temps de pré-incubation : par comparaison des courbes obtenues pour les différents composés, on peut classer les inhibiteurs par rapport au composé contrôle positif. Des graphiques représentatifs validant cette méthode sur les trois isoformes des cytochromes P450 sont rapportés sur la figure 3.3.

En observant ces graphiques on peut voir les composés qui sont simplement des inhibiteurs suicides et ceux qui ont aussi une composante d'inhibition réversible. La furafylline et le méthimazole montrent cette différence : le méthimazole est un inhibiteur avec une basse affinité pour le CYP1A2 (IC₅₀ > 50 μM) et l'activité du cytochrome P450 au temps zéro de la pré-incubation est proche au 100% ; par contre, la furafylline est un inhibiteur avec une bonne affinité pour le CYP1A2 (IC₅₀ = 4.2 μM), c'est déjà un inhibiteur compétitif, et donc plus la concentration initiale est haute, plus l'activité du cytochrome P450 au temps zéro est basse (figure 3.3 (a)).

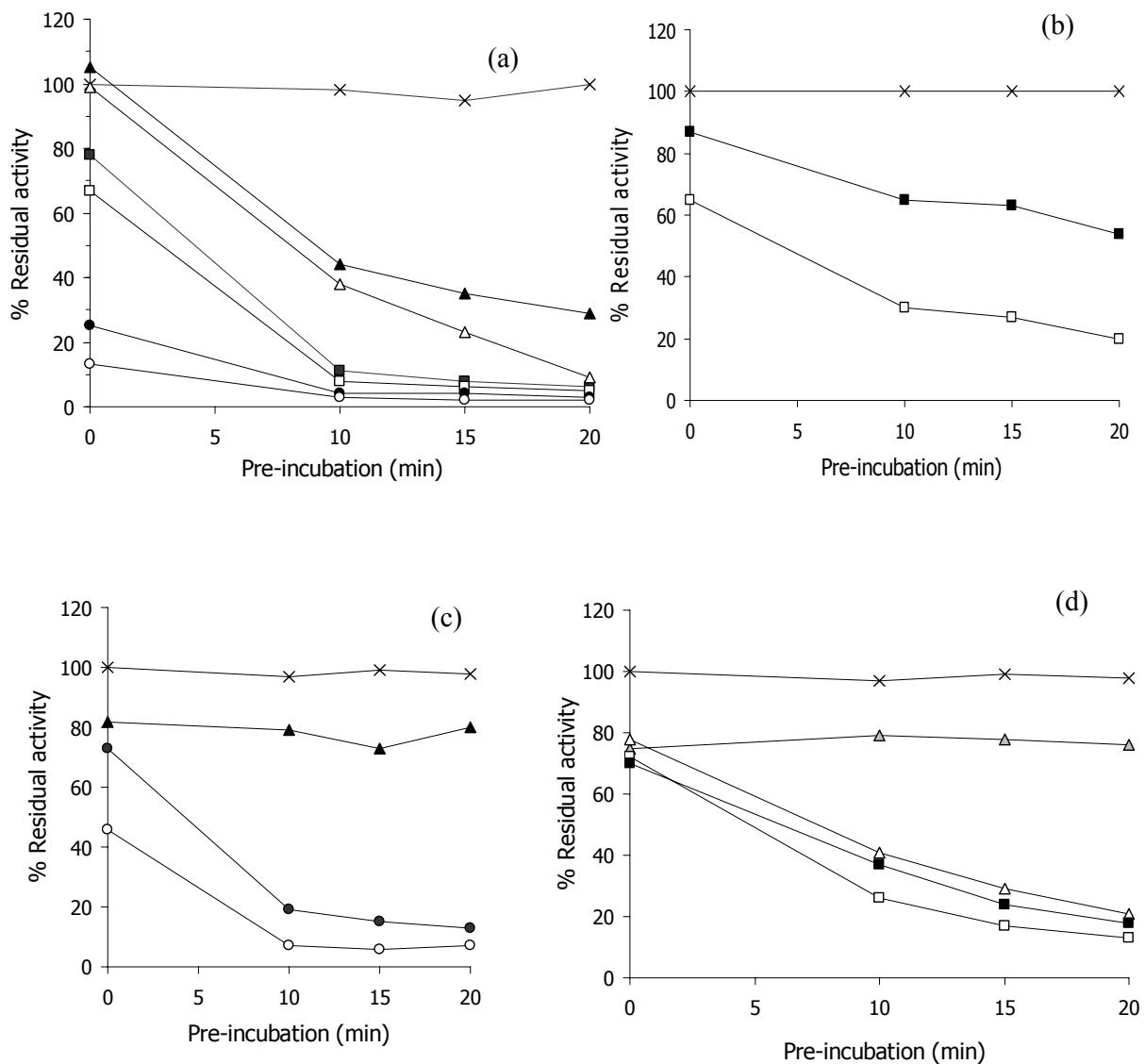


Figure 3.3 : Graphiques représentatifs utilisés pour valider la méthode de détermination de l'inhibition en fonction du temps de pré-incubation (TDI). Le contrôle négatif contient uniquement le solvant de l'inhibiteur (DMSO 0.5% v/v). (a) TDI sur le CYP1A2 par la furafylline (■ 1.25 μ M, □ 2.5 μ M, ● 12.5 μ M, ○ 25 μ M) et le méthimazole (▲ 50 μ M, △ 500 μ M) ; (b) TDI sur le CYP2C9 par la cimetidine (■ 50 μ M, □ 250 μ M) ; (c) TDI sur le CYP3A4 par le ritonavir (▲ 0.03 μ M), la troléandomycine (● 1.0 μ M) et le mibéfradil (○ 0.13 μ M) ; (d) TDI sur le CYP3A4 par le tamoxifen (△ gris, 7.0 μ M), le diltiazem (△ 20 μ M), le 17- α -éthynylestradiol (■ 2 μ M) et l'érythromycine (□ 20 μ M). On peut remarque que les activités initiales des cytochromes P450 avec les différentes substances correspondent à l'effet d'inhibition compétitive, et qu'elles se comportent non seulement comme inhibiteurs suicides mais aussi comme inhibiteurs réversibles. Chaque point sur les graphiques représente la valeur moyenne de deux mesures.

3.4 Méthode pour la détermination de l'inhibition dépendante du temps (TDI) en suivant « on-line » la cinétique d'inactivation

La méthode pour la détermination de la TDI en suivant « on-line » la cinétique d'inactivation est une méthode de calcul, qui utilise les données de la fluorescence mesurée avec le test pour l' IC_{50} (décrit en section 3.2.b). Comme il s'agit d'une méthode de calcul, il n'est pas nécessaire d'effectuer des expériences additionnelles au test de détermination de l' IC_{50} , mais on utilise les mêmes données pour des calculs différents. Grâce à cette méthode il est possible de calculer l' IC_{50} et les constants qui décrivent le processus d'inactivation du cytochrome P450 (K_I et k_{inact}) en utilisant les données obtenues avec une seule expérience.

Donc, la préparation de la microplaque, les concentrations des cytochromes P450, les substrats utilisés et les procédures générales sont celles décrites pour la mesure de l' IC_{50} . On n'effectue aucune pré-incubation, mais la réaction d'inactivation du cytochrome P450 et celle de métabolisation du substrat en un produit fluorescent ont lieu au même temps (co-incubation). On n'effectue aucune dilution du mélange de réaction cytochrome P450-inhibiteur, et de cette façon l'inhibiteur peut réagir soit en mode compétitif soit en mode « mechanism-based ».

La méthode a été développée sur le principe que la puissance d'inhibition des inhibiteurs suicides augmente dans le temps.

Comme conséquence, la valeur de l' IC_{50} diminue dans le temps. On peut repérer immédiatement un inhibiteur dépendant du temps, en comparant les valeurs d' IC_{50} au début (après 2 minutes) et à la fin (après 15 minutes) de la mesure de la fluorescence en mode cinétique (figure 3.4). Si la deuxième valeur est significativement plus basse que la première, le composé en question est un inhibiteur dépendant du temps.

La diminution de l' IC_{50} est une caractéristique de la TDI, mais l'ampleur de cette variation dépend de nombreux facteurs : c'est seulement une indication qualitative. Mais souvent on a besoin d'obtenir des résultats quantitatifs, pour déterminer la gravité du phénomène d'inactivation du cytochrome P450 et pour comparer différents composés et d'accomplir une analyse plus approfondie.

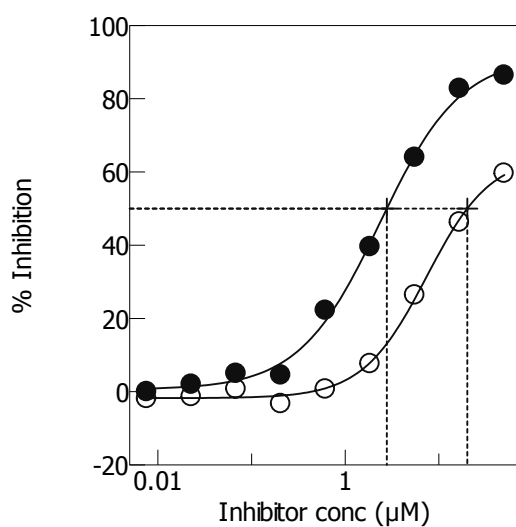


Figure 3.4 : Comparaison entre courbes d'inhibition utilisées pour le calcul de l' IC_{50} du gestodène au début de la mesure cinétique de la fluorescence (○ IC_{50} = 27.7 μ M) et à la fin de la cinétique, après 15 minutes (● IC_{50} = 2.88 μ M). Une augmentation si évidente de la puissance d'inhibition est une indication de probabilité d'inhibition suicide.

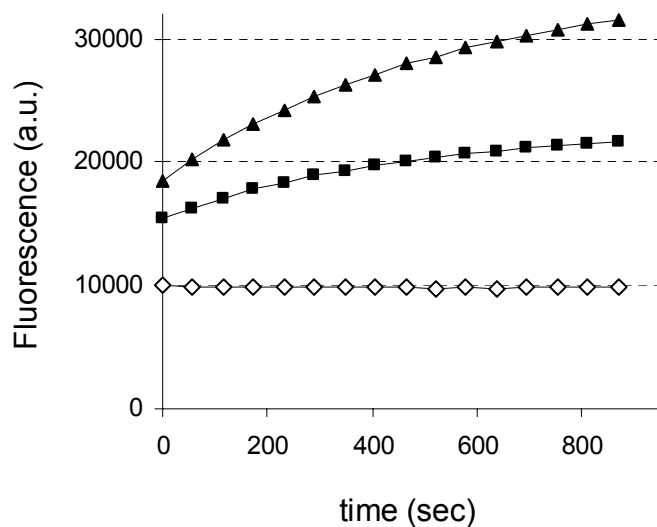


Figure 3.5 : Graphique des données brutes de l'augmentation de la fluorescence du produit de la métabolisation de la BFC par le CYP3A4 en fonction du temps et pour chaque concentration d'inhibiteur (▲ 5.6 μ M ; ■ 50 μ M ; ◇ blanc).

On a écrit un programme électronique (dans le programme Excel) qui effectue tous les calculs à partir des données brutes de fluorescence jusqu'aux constantes K_I et k_{inact} . Il calcule la vitesse de réaction à chaque minute, à partir des données de fluorescence : il soustrait les valeurs des blancs aux données brutes, et ensuite il calcule la pente de la courbe de fluorescence en fonction du temps (vitesse de réaction), entre chaque couple de points. Cette pente est exprimée comme le pourcentage de la pente de la courbe de fluorescence en fonction du temps, à chaque point, pour le contrôle négatif, en absence d'inhibiteur. Ces valeurs, en échelle logarithmique, sont reportées dans un graphique en fonction du temps (log(reaction rate) vs. time), et le programme calcule la pente de la droite d'interpolation des points et à partir de cette valeur, la k_{obs} ($k_{obs} = \text{pente} \cdot \ln 10$), pour chaque concentration d'inhibiteur ($[I]$) (figure 3.5 et 3.6). Ces valeurs sont donc portées dans un deuxième graphique (k_{obs} vs. $[I]$) pour l'ajustement dans une équation dérivée de l'équation de Michaelis-Menten :

$$k_{obs} = \frac{k_{inact} \cdot [I]}{K_I + [I]} \quad (\text{Équation 3.2})$$

où la k_{obs} est la pente de la courbe de la vitesse de réaction à chaque concentration d'inhibiteur, $[I]$ est la concentration d'inhibiteur, K_I et k_{inact} sont les constants qui décrivent la réaction d'inactivation. Par optimisation des paramètres de l'équation, on obtient les constantes thermodynamique et cinétique qui décrivent le processus d'inhibition dépendante du temps ; K_I (μM) et k_{inact} (min^{-1}) respectivement (figure 3.7).

L'ajustement direct des valeurs dans l'équation est préférable. Quand on se doute que le mécanisme d'inhibition ne suit pas strictement l'équation de Michaelis-Menten pour les concentrations élevées, on peut effectuer une correction et refaire le calcul en utilisant seulement les concentrations d'inhibiteur les plus faibles.

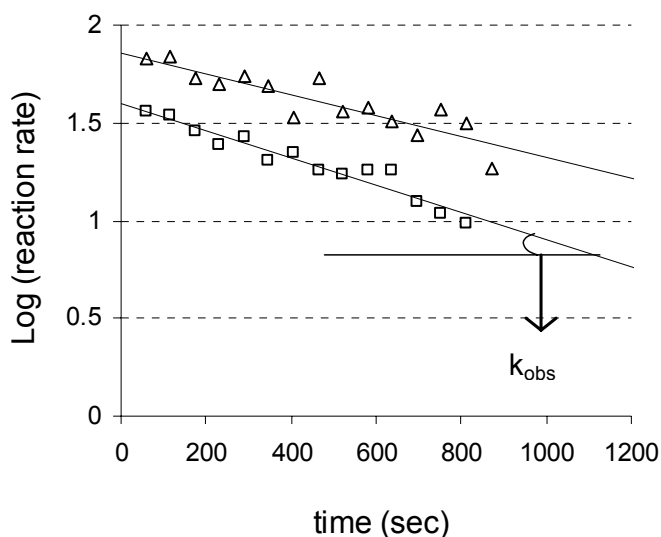


Figure 3.6 : À partir des données brutes (figure 3.5) de l'activité du CYP3A4 en fonction du temps et pour chaque concentration d'inhibiteur, on calcule les différentes vitesses de la réaction (k_{obs}) (□ 5.6 μM ; Δ 50 μM). Ces valeurs de vitesse seront utilisées pour le calcul des constantes de l'inactivation, en fonction des concentrations d'inhibiteur utilisées.

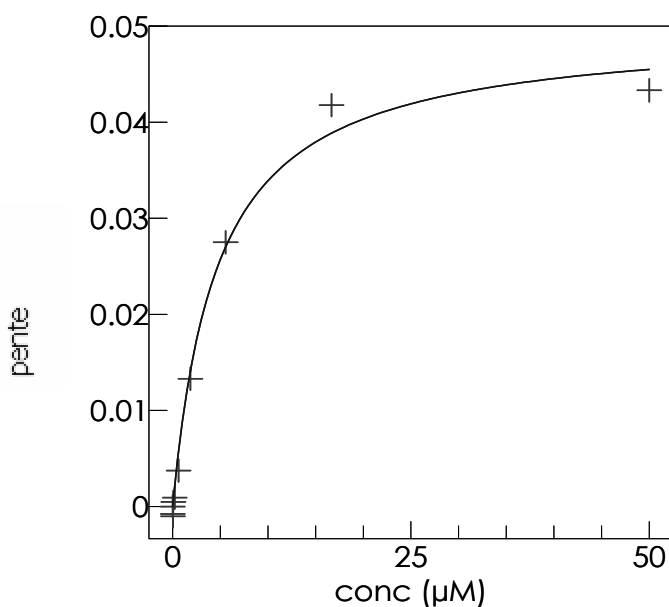


Figure 3.7 : Graphique pour le calcul de K_i et k_{inact} pour la réaction de TDI. Les différents k_{obs} obtenus des graphiques précédents sont reportés en fonction des concentrations d'inhibiteur, et les données sont ajustées dans l'équation dérivée de Michaelis-Menten pour le calcul des paramètres du processus d'inactivation.

3.4.a Validation de la méthode de détermination de la TDI

Bien que la méthode soit applicable à toutes les isoformes de cytochromes P450, elle a été validée ici que pour le CYP3A4.

Une sélection de 8 composés décrits dans la littérature comme inhibiteurs suicides du CYP3A4, a été choisie pour la validation de la méthode présentée ici. Les composés sont tous des médicaments et ils sont faciles à trouver dans le commerce : érythromycine, 17- α -éthynylestradiol, troléandomycine, vérapamil, saquinavir, diltiazem, mifépristone, gestodène. Des graphiques représentatifs de la validation de cette méthode sont présentés en figure 3.7.

L' IC_{50} (μM), la K_I (μM) et la k_{inact} (min^{-1}) ont été calculées à partir des données de fluorimétrie obtenues en réalisant l'expérience huit fois.

La reproductibilité de la méthode a été évaluée par calcul de l'erreur standard entre les différentes mesures, sur les deux paramètres descriptifs de l'inhibition suicide : la k_{inact} et la K_I (tables 3.9 et 3.10). Un calcul d'erreur a été effectué aussi sur les valeurs d' IC_{50} des mêmes inhibiteurs suicides utilisés pour la validation de la méthode (table 3.11).

Le test montre une bonne reproductibilité, avec des erreurs standard sur les mesures de K_I et k_{inact} qui sont compris entre le 2 et 13%.

Une telle variabilité peut être acceptée si on considère les objectifs de cette méthode qu'est un test préliminaire de screening, à haut débit.

Un tel test a comme finalité de fournir des indications sur la capacité des composés à provoquer une inhibition dépendante du temps, et de donner une indication quantitative de la puissance de l'inhibiteur suicide. Dans la réalisation de ce nouveau test pour la détection de l'inhibition dépendante du temps, il n'y a aucune pré-incubation ni aucune dilution du mélange d'incubation contenant le cytochrome P450 en interaction avec l'inhibiteur, mais on fait une co-incubation du cytochrome P450, l'inhibiteur et le substrat et on suit la cinétique d'inactivation en suivant l'augmentation de la fluorescence du produit en fonction du temps. De cette façon, on ne peut pas distinguer la contribution à l'inhibition due à l'inhibiteur suicide (avec liaison irréversible cytochrome P450-inhibiteur) et celle due à une éventuelle inhibition compétitive. Cette approximation est une conséquence de la simplification de la procédure expérimentale.

Donc, dans le cas de détection d'un inhibiteur dépendant du temps par cette méthode fluorimétrique, des expériences ultérieures sont conseillées pour préciser la nature de l'inhibition.

Composés	n=	K _I (max) - μM	K _I (min) - μM	K _I (average) - μM	SEM
Troléandomycine	8	1.35	0.473	0.976	0.126
Saquinavir	8	3.21	1.54	2.44	0.210
Diltiazem	8	3.44	1.67	2.51	0.239
Erythromycine	7	29.9	14.5	21.5	2.13
Mifépristone	8	1.13	0.819	0.927	0.043
Gestodène	8	4.94	1.95	2.83	0.331
17- α -éthynylestradiol	6	2.49	2.19	2.38	0.051
Vérápamil	8	3.69	2.43	3.17	0.131

Table 3.9 : Variabilité des valeurs de K_I calculées avec la méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps dans des tests effectués sur un période d'une année.

Composés	n=	k _{inact} (max) – min ⁻¹	k _{inact} (min) - min ⁻¹	k _{inact} (average) - min ⁻¹	SEM
Troléandomycine	8	0.159	0.064	0.110	0.014
Saquinavir	8	0.117	0.060	0.086	0.009
Diltiazem	8	0.025	0.012	0.022	0.002
Erythromycine	7	0.096	0.067	0.077	0.004
Mifépristone	8	0.090	0.055	0.083	0.004
Gestodène	8	0.113	0.076	0.104	0.005
17- α -éthynylestradiol	6	0.087	0.063	0.071	0.004
Vérápamil	8	0.136	0.085	0.109	0.007

Table 3.10 : Variabilité des valeurs de k_{inact} calculées avec la méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps dans des tests effectués sur un période d'une année.

Composés	n=	IC ₅₀ (max) - μM	IC ₅₀ (min) - μM	IC ₅₀ (average) - μM	SEM
Troléandomycine	7	2.11	0.604	1.28	0.187
Saquinavir	8	0.836	0.569	0.728	0.0317
Diltiazem	6	47.8	21.8	31.5	4.26
Erythromycine	7	41.2	13.5	30.1	4.32
Mifépristone	7	7.87	2.21	4.51	1.06
Gestodène	6	8.29	4.28	6.41	0.567
17- α -éthynylestradiol	6	7.99	4.01	6.23	0.619
Vérápamil	8	3.93	3.01	3.37	0.108

Table 3.11 : Variabilité des valeurs d'IC₅₀ calculées sur les composés utilisés pour la validation de la méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps dans des tests effectués sur un période d'une année.

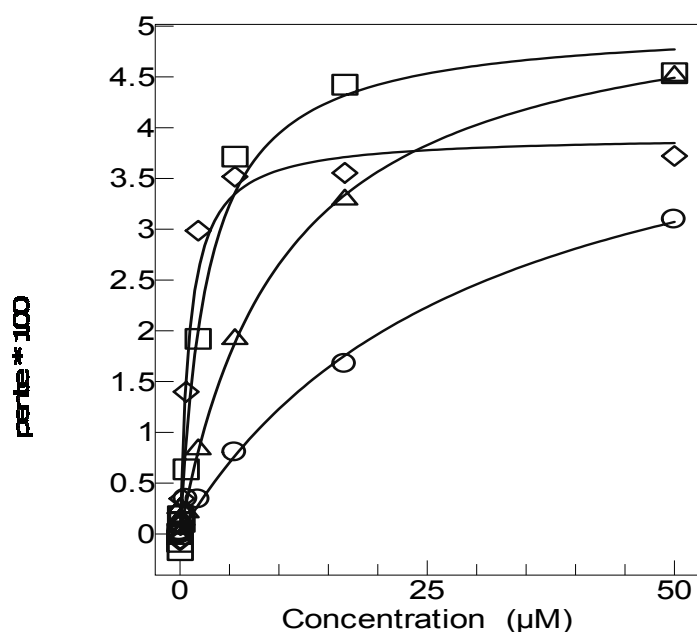


Figure 3.8 : Graphiques représentatifs de la validation de la méthode pour la détermination de la TDI sans pré-incubation. Les substances présentés ici sont l'érythromycine (○), le 17- α -éthynylestradiol (Δ), le mifépristone (◇) et le gestodène (□). On a effectué l'ajustement direct des données dans l'équation dérivée de l'équation de Michaelis-Menten (Eq. 2) présentée en section 3.4.

Composés	K_I (μM)	k_{inact} (min^{-1})	k_{inact} / K_I
Diltiazem	3.4 ± 0.24	0.022 ± 0.0020	0.009
Erythromycine	30 ± 2.1	0.077 ± 0.0040	0.003
17-α-éthynylestradiol	2.5 ± 0.051	0.071 ± 0.0038	0.028
Saquinavir	3.2 ± 0.21	0.086 ± 0.0086	0.027
Vérapamil	3.7 ± 0.13	0.109 ± 0.0067	0.029
Gestodène	4.9 ± 0.33	0.104 ± 0.0052	0.021
Troléandomycine	1.4 ± 0.13	0.110 ± 0.0140	0.079
Mifépristone	1.1 ± 0.043	0.083 ± 0.0043	0.075

Table 3.12 : Résumé des résultats obtenus avec la nouvelle méthode de calcul basée sur les données de fluorescence (moyenne \pm erreur standard).

On peut comparer les données obtenues par cette méthode de calcul et les résultats présentés dans la littérature scientifique. Comme déjà souligné pour les valeurs d' IC_{50} , les résultats concernant l'inhibition suicide qu'on peut trouver dans la littérature sont très variés. Par exemple, pour le diltiazem, on trouve des valeurs de K_I et k_{inact} respectivement compris entre $3.3 \pm 1.5 \mu M$ et $0.07 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ (Yeo, 2001), $2.20 \mu M$ et 0.17 min^{-1} (Jones, 1999) et $0.5 \mu M$ et 0.010 min^{-1} (Ma, 2000) ; les résultats obtenus avec le nouveau test, sont comparables à ces données.

Pour le vérapamil, les valeurs de K_I et k_{inact} en littérature sont compris respectivement entre $6.46 \mu M$ et 0.39 min^{-1} , $2.97 \mu M$ et 0.64 min^{-1} (Wang, 2004) et $2.9 \pm 0.6 \mu M$ et $0.15 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$ (Yeo, 2001). Aussi dans ce cas les valeurs calculées dans notre laboratoire sont en bon accord avec la littérature.

Egalement, pour le 17- α -éthynylestradiol les résultats présentés dans cette thèse sont similaires à ceux rapportés dans la littérature : K_I entre 18 et $0.90 \mu M$ et k_{inact} entre 0.020 et 0.040 min^{-1} (Lin, 2002; Mills, 1999).

Ces inhibiteurs suicides ont aussi des effets *in vivo*, et ils provoquent des interactions médicamenteuses chez les patients. Par exemple, les contraceptifs (17- α -éthynylestradiol et gestodène) provoquent une augmentation de l'aire sous la courbe (AUC) du midazolam de 25% (Palovaara, 2000) par inhibition suicide du CYP3A4 ; les macrolides (érythromycine et troléandomycine) une augmentation de l'AUC du midazolam de 4.5 fois et de l'alprazolam de 2.5 fois (Olkkola, 1993 ; Yasui, 1996) ; le diltiazem et le verapamil provoquent une augmentation de l'AUC du midazolam de 3.8 et 3 fois respectivement (Backman, 1994).

Dans la littérature on trouve des nombreuses études sur les inhibiteurs suicides du CYP3A4, soit *in vitro*, soit *in vivo*. Cependant, à partir des données *in vitro* il est très difficile de prévoir les effets *in vivo* des inhibiteurs suicides. Des modèles ont été construits et dans certains cas, la corrélation des résultats est bonne (Ito, 2003). L'extrapolation des données *in vivo* à partir de la K_I et la k_{inact} est une opération risquée, car la réponse *in vivo* est souvent disproportionnée.

Les effets sur la pharmacocinétique *in vivo* (rapport des AUC du médicament en présence et en absence d'inhibiteur) dépendent principalement du rapport entre la constante de dégradation (qui est égale à la constante de régénération, en état stationnaire) de l'isoforme de cytochrome P450 inactivée (k_{degrad}), de la concentration d'inhibiteur qui arrive au cytochrome P450, et des constantes cinétiques de l'inactivation (k_{inact} et K_I) (Venkatakrishnan, 2005). Si le turnover du cytochrome P450 est assez rapide, l'inhibition suicide n'aura pas des conséquences graves *in vivo*, chez les patients. A partir de ces considérations on a choisi un composé contrôle, sont les

constantes ont des valeurs limite, pour classer les composés inconnus qu'on analyse avec cette méthode cinétique : le vérapamil. Donc, tout composé avec une puissance d'inhibition plus haute du vérapamil est considéré dangereux pour les patients.

3.5 Comparaison entre les deux méthodes de détermination de la TDI par fluorimétrie : avec pré-incubation et par suivi de la cinétique d'inactivation

La nouvelle méthode de calcul pour la détermination de la TDI offre plusieurs avantages par rapport à la plus ancienne méthode fluorimétrique, avec la pré-incubation.

Le premier avantage est qu'elle n'est qu'un traitement mathématique différent des données, qui ne nécessite pas d'expériences supplémentaires à l'essai pour la détermination de l'IC₅₀, mais on utilise les mêmes données pour calculer les constantes caractérisant la réaction d'inactivation du cytochrome P450, si elle a lieu. Par contre, la méthode avec la pré-incubation nécessite la mesure de l'IC₅₀ pour choisir les concentrations d'inhibiteurs à utiliser, et ensuite on effectue la détermination de la TDI dans une deuxième expérience.

La conséquence de cette différence est que avec la deuxième méthode on épargne, soit du temps pour obtenir les résultats, soit des produits employés.

La méthode avec la pré-incubation dans une microplaque à 96 puits permet de mesurer l'activité résiduelle des cytochromes P450, pour quatre temps de pré-incubation (en duplicat) et à deux concentrations d'inhibiteur. Pour les calculs de la méthode sans pré-incubation, on peut utiliser les données obtenues avec le test de détermination de l'IC₅₀ : dans une plaque, on mesure l'activité résiduelle des cytochromes P450 pendant la réaction avec l'inhibiteur (en 9 concentrations, plus le blanc) et on la suit pendant 16 minutes (1 points de fluorescence / minute) d'incubation (mesure simple). Donc le nombre de points de fluorescence obtenus avec la nouvelle méthode est beaucoup plus important qu'avec l'ancienne méthode. Cette abondance de données permet l'ajustement de l'équation dérivée de Michaelis-Menten (équation 3.2), chose qui n'est pas possible avec le petit nombre de données obtenues par l'expérience avec la pré-incubation. La nouvelle méthode donne donc des résultats quantitatifs – les constantes de la réaction d'inhibition (K_I et k_{inact}) – impossibles à obtenir avec l'ancienne méthode. En plus, la vieille méthode ne peut être utilisée que comme méthode semi-quantitative, par comparaison avec un composé contrôle positif.

Cette nouvelle méthode est simple et à haut débit (« high throughput ») et elle permet de calculer l'IC₅₀, la K_I et la k_{inact} d'un composé en une seule expérience. Cependant, cette méthode a aussi des inconvénients. En effet la mesure d'activité résiduelle après pré-incubation est effectuée sans

dilution, au contraire de la plupart des méthodes plus traditionnelles (pré-incubation, dilution et quantification des métabolites produits). Ceci fait que l'élément compétitif de l'inhibition ne peut pas être ignoré. Si, en utilisant la nouvelle méthode, on trouve qu'un composé est un inhibiteur dépendant du temps, il est nécessaire d'accomplir des expériences supplémentaires pour confirmer le fait que c'est effectivement un inhibiteur suicide. En fait, la dépendance du temps est seulement une importante caractéristique des inhibiteurs suicides, mais elle ne suffit pas pour classer un composé.

De toute façon, cette méthode peut être employée pour effectuer une distinction entre l'inhibition dépendante du temps et l'inhibition réversible et pour déterminer l'efficacité de la TDI, en calculant les valeurs des constants du processus d'inhibition.

Cette méthode n'a été développée et validée que pour le CYP3A4, mais on pourrait la valider et l'employer après validation sur les autres isoformes de cytochromes P450.

**4. Application des outils développés
à un projet de recherche:
les antagonistes du récepteur A2a**

4. Application de la stratégie pour diminuer les risques d'interactions médicamenteuses à un projet de recherche : les antagonistes du récepteur A_{2a} pour l'adénosine.

L'adénosine est un régulateur endogène important. L'adénosine agit à travers quatre sous-types de récepteurs (A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3), couplés avec des protéines G (Fredholm, 1994). Les récepteurs A_{2a} sont très exprimés dans les régions du caudato-putamen, et nucleus accumbens du cerveau. Dans ces régions le récepteur A_{2a} a une fonction de modulateur la neurotransmission de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), de l'acétylcholine et du glutamate (Ochi, 2000 ; Mori, 1996). Ces actions du récepteur A_{2a} ont été reconnues comme importantes pour la régulation des fonctions du mouvement (Kuwana, 1999). Donc la modulation du récepteur A_{2a} produit des changements dans la régulation du mouvement. En fait, les antagonistes A_{2a} préviennent les problèmes de motilité de différents modèles animaux de la maladie de Parkinson (Kuwana, 1999 ; Pinna, 2005). Donc les antagonistes du récepteur A_{2a} pour l'adénosine, sont des médicaments potentiels pour le traitement des symptômes de cette pathologie.

Dans les dernières années des grandes efforts ont été focalisés sur la synthèse de molécules d'inhibiteurs puissants et sélectifs pour le récepteur A_{2a} . La spécificité pour ce récepteur est fondamentale, surtout par rapport au récepteur A_1 , qui agit au niveau du système cardiovasculaire. Dans la littérature, on trouve de nombreuses molécules de bonne affinité pour le récepteur A_{2a} , mais souvent pas suffisamment spécifiques, comme est le cas de plusieurs dérivés de l'adénine (Klotz, 2003).

Une structure de base identifiée pour l'interaction avec le récepteur A_{2a} est celle d'une aminopyrimidine substituée. Mais aussi bien les composés développés chez Hoffmann-La Roche (Jakob-Roetne, 1999), que ceux développés dans d'autres firmes pharmaceutiques (Poucher, 1995 ; Zocchi, 1996) ont tous comme sous-structure fixe pour la sélectivité sur le récepteur A_{2a} , un furane (figure 4.1) (Cacciari, 2003 ; Vu, 2005 ; Pinna, 2005).

Le furane est une des sous-structures bien connues pour être métabolisées en intermédiaires réactifs qui peuvent se lier de façon covalente aux protéines microsomales (Ravindranath, 1984). Donc ces molécules sont des potentiels inhibiteurs suicides des cytochromes P450.

On a utilisé les outils développés et présentés dans cette thèse pour étudier une classe de composés antagonistes de ce récepteur A_{2a} pour l'adénosine.

D'abord on a individualisé le cycle furane comme alerte structurale, en utilisant la base de données ISIS. En suite on a vérifié la capacité des composés sous analyse de provoquer l'inhibition dépendante du temps. Et donc on a réalisé une série d'expériences supplémentaires pour montrer l'inhibition suicide du CYP3A4, la liaison covalente des produits réactifs aux protéines microsomales et on a identifié des métabolites réactifs et proposé un chemin réactionnel pour expliquer l'inactivation suicide.

La dernière étape a été de tenter de protéger le CYP3A4 de l'inactivation, en synthétisant de dérivés avec des substituants différents sur le cycle furane. On a identifiés les groupements plus efficaces pour la prévention de l'inhibition suicide par une analyse des relations structure activité (SAR).

4.1 Études préliminaires

4.1.a Détermination de l'IC₅₀ sur cinq isoformes de cytochromes P450

Les deux composés RO0674274 et RO0683569 (figure 4.1) ont été testés sur cinq isoformes de cytochromes P450 pour vérifier leur activité comme inhibiteurs compétitifs pour les différentes isoformes et comparer les valeurs d'IC₅₀ obtenues. Les isoformes sur lesquelles l'IC₅₀ a été déterminée sont considérées comme les plus importantes participant au la métabolisme des xénobiotiques chez l'homme : CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6.

Le test de mesure de l'IC₅₀ (section 7.2) a été effectué en duplicat et les résultats rapportés (table 4.1) sont les valeurs moyennes de deux mesures.

Les deux composés se sont révélés comme inhibiteurs des différentes isoformes des cytochromes P450, mais aucun des deux composés n'est un inhibiteur très fort. Une des isoformes, le CYP2D6, n'est inhibée par aucun des deux composés.

Les affinités des composés pour les différentes isoformes de cytochromes P450 sont les suivantes : RO0674274 est un inhibiteur assez fort des CYP3A4, CYP2C19 et CYP2C9 (IC₅₀ *ca.* 2 µM), mais c'est un inhibiteur marginal des CYP1A2 et CYP2D6 (IC₅₀ > 50 µM). Par contre, le composé RO0683569 est un inhibiteur modéré sur les CYP1A2 et CYP2C9 (IC₅₀ entre 5 et 10 µM), et il n'inhibe presque pas les CYP3A4, CYP2C19 et CYP2D6 (IC₅₀ > 50 µM).

Donc, apparemment il n'y a pas de souci concernant l'inhibition dépendante du temps des cytochromes P450 par les composés sous analyse. Mais, en observant la courbe cinétique de l'augmentation de la fluorescence du produit du métabolisme de la BFC en fonction du temps, c'est-à-dire de l'activité du CYP3A4 (figure 4.2), on remarque que l'activité du cytochrome P450

n'est pas linéaire du début jusqu'à la fin de la mesure (16 minutes). Alors que l'activité du CYP3A4 recombinant est stable pendant une cinétique d'environ 25 minutes à 37 °C (Gentest product information sheet), cette diminution progressive de l'activité enzymatique peut indiquer la participation d'une inhibition dépendante du temps (TDI).

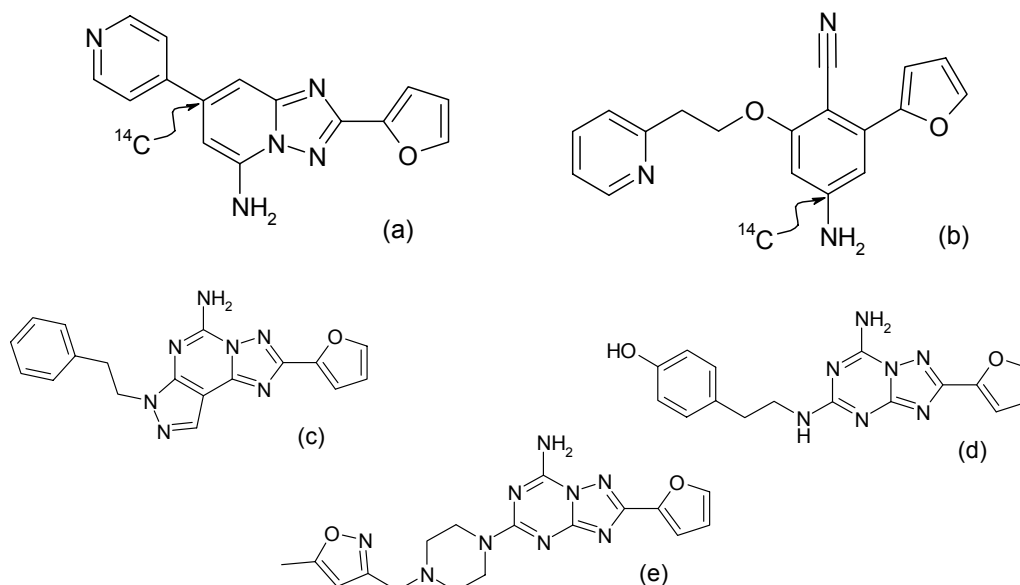


Figure 4.1 : Structures des deux composés sous analyse comme inhibiteurs suicides (a) RO0674274 et (b) RO0683569. Les dérivés radioactifs (utilisés pour les expériences décrites en Section 4.2) sont marqués avec le ^{14}C dans les positions indiquées. Comparaison avec les structures d'antagonistes du récepteur A_{2a} développés par autres firmes et laboratoires pharmaceutiques : (c) SCH 58261 ; (d) ZM 241385 ; (e) pipérazine dérivés du [1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine.

Toutes ces molécules ont le furane comme sous-structure commune et nécessaire pour la spécificité sur les récepteurs A_{2A} , qui sont leur cible thérapeutique.

	IC_{50} (μM)				
	CYP3A4	CYP1A2	CYP2D6	CYP2C9	CYP2C19
RO0674274	2.60	>50	>50	1.60	1.22
RO0683569	>50	10.7	>50	5.13	>50

Table 4.1 : Résumé des résultats des tests pour la détermination de l' IC_{50} des deux composés sous analyse sur les différentes isoformes de cytochromes P450. Les valeurs rapportées sont les valeurs moyennes de deux mesures.

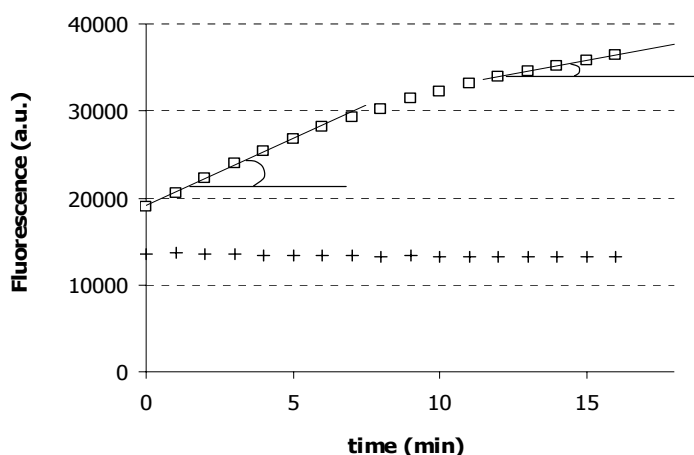


Figure 4.2 : Courbe de l'augmentation de la fluorescence du produit de la métabolisation de la BFC par le CAP3A4, pendant une mesure cinétique en présence de l'inhibiteur RO0683569 (50 μ M, \square ; blanc, +). L'image ci-dessus correspond à une seule concentration d'inhibiteur (50 μ M) sur une seule plaque. La pente de la courbe (activité du CYP3A4) au début de la mesure est beaucoup plus forte qu'à la fin de cinétique, ce qui montre une probable inhibition dépendant du temps.

4.1.b Détermination de l'inhibition dépendante du temps (TDI)

La variation de la puissance d'inhibition en fonction du temps d'incubation est une caractéristique importante des inhibiteurs suicides (mechanism-based), et donc elle est considérée comme le premier symptôme de ce type d'inactivation.

L'inhibition dépendante du temps (TDI) a été mesurée pour les deux substances analysées en suivant la méthode décrite dans la section 7.3. Elle est composée de deux phases : la première est une phase de pré-incubation du cytochrome P450 avec l'inhibiteur, en présence de système régénérateur de NADPH ; la deuxième est une phase d'incubation du cytochrome P450 avec son substrat spécifique et le système régénérateur de NADPH et, en même temps, de mesure de la production du métabolite fluorescent comme marque de l'activité résiduelle du cytochrome P450 après différents temps (0, 10, 15, 20 minutes) de pré-incubation.

Les substances ont été testées sur les cinq isoformes sur lesquelles on avait déjà déterminé l' IC_{50} , y compris les deux isoformes (CYP2D6 et CYP2C19) pour lesquelles la méthode de détermination de la TDI n'avait pas été validée (Section 3.3). Le principe du test, pour toutes les isoformes, est d'employer les mêmes conditions du test de détermination de l' IC_{50} , et d'ajouter une phase de pré-incubation, avant la mesure de l'activité du cytochrome P450.

Les composés ont été testés à trois concentrations, déterminées à partir des valeurs de l'IC₅₀.

Sur les CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2D6, aucun des deux composés n'a montrée d'inhibition dépendant du temps (figure 4.3).

Sur le CYP3A4, les deux composés donnent une inhibition dépendant du temps (TDI) : le RO0683569 de façon évidente (activité résiduelle après 20 minutes de pré-incubation = 14% à la concentration de 25 μ M) ; le RO0674274 ne cause pas une diminution dramatique de l'activité du CYP3A4 en 20 minutes de pré-incubation (activité résiduelle = 30% à la concentration de 10 μ M).

Donc, pour confirmer la TDI sur le CYP3A4 par les deux molécules, on a répété l'expérience de détermination de l'inhibition dépendant du temps dans les mêmes conditions mais en utilisant des temps de pré-incubation plus longs (0, 10, 20, 40 minutes).

Avec une pré-incubation plus longue, le CYP3A4 a plus de temps pour métaboliser les inhibiteurs suicides dans des intermédiaires réactifs qui inactivent le cytochrome P450 même. En fait, l'activité du CYP3A4 après 40 minutes de pré-incubation avec le RO0674274 est seulement du 17% à concentration de 10 μ M, et avec le RO0683569 est du 2% à concentration de 25 μ M (figure 4.4).

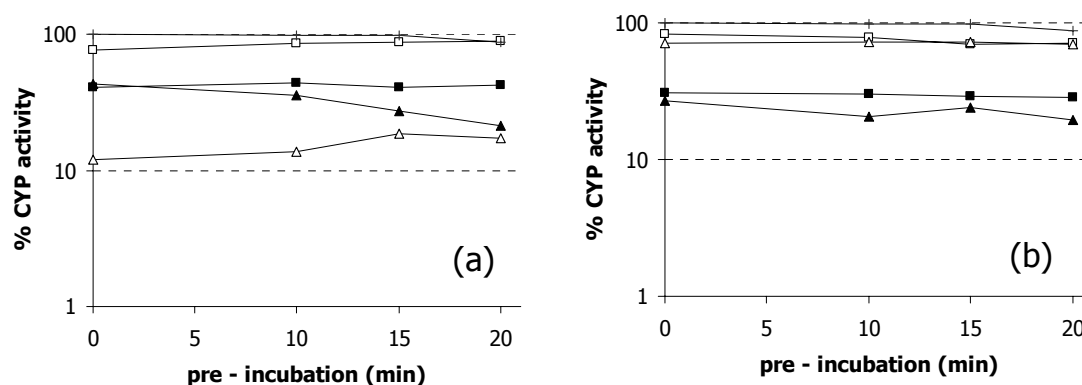


Figure 4.3 : Graphiques de l'activité des différentes isoformes de cytochromes P450 après différents temps de la pré-incubation avec les composés sous analyse (a) RO0674274 25 μ M et (b) RO0683569 25 μ M. Les deux composés ne provoquent pas de la TDI, sur aucune des isoformes suivantes : CYP2D6 (□), CYP2C9 (■), CYP2C19 (Δ), CYP1A2 (▲). L'inhibition due au DMSO (contrôle) est aussi indiquée dans les graphiques (+) ; les activités des cytochromes P450 sont exprimées comme pourcentages de l'activité du contrôle au temps zéro de pré-incubation.

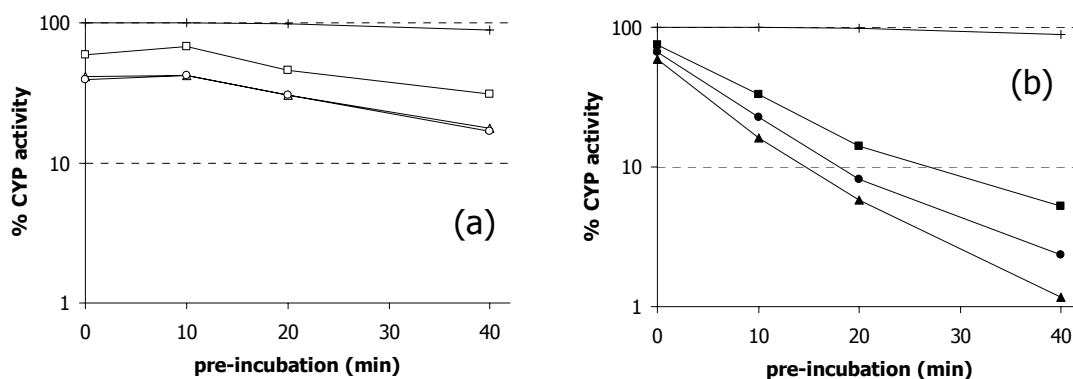


Figure 4.4 : Graphiques représentant l'inhibition dépendante du temps (TDI) par les deux composés sous analyse sur le CYP3A4 : (a) RO0674274 et (b) RO0683569. Les composés ont été testés en trois concentrations calculées à partir de la valeur de l' IC_{50} . Le premier composé a été employé en concentration de 25 μ M (Δ), 10 μ M (\circ) et 2.5 μ M (\square) ; le deuxième composé a été testé en concentration de 125 μ M (\blacktriangle), 62.5 μ M (\bullet) et 25 μ M (\blacksquare). L'inhibition est exprimée comme pourcentage de l'activité du CYP3A4 dans l'incubation de contrôle, en absence d'inhibiteur (+).

On a en suite répété l'expérience de détermination de la TDI en utilisant les mêmes temps de pré-incubation (jusqu'à 40 minutes), mais en analysant les deux composés à plusieurs concentrations, de façon d'obtenir un nombre de données suffisant pour calculer les constantes qui décrivent le processus d'inactivation (K_I et k_{inact}). Les données d'inhibition à différents temps de pré-incubation ont été élaborées comme décrit dans l'explication de la méthode de calcul (section 3.2.b) et on a calculé les paramètres selon l'équation dérivée de l'équation de Michaelis–Menten (figure 4.5) pour les cinétiques de pseudo-premier ordre.

L'expérience a été réalisée aussi en absence de système régénérateur de NADPH, et dans ce cas n'on a observé aucune inhibition dépendante du temps. Mais, puisque le composé RO0674274 a aussi une certaine activité comme inhibiteur réversible du CYP3A4, on observe l'inhibition de l'activité du cytochrome P450 même en absence de système régénérateur de NADPH et au temps zéro de la pré-incubation.

Tous les résultats sont résumés dans les tables 4.2 et 4.3 ; les expériences sont toujours réalisées en duplicat et les valeurs rapportées des activités résiduelles et des constants sont les moyennes de deux mesures.

Le composé RO0674274 a une affinité (exprimée par la K_I) pour le CYP3A4 légèrement plus haute que le RO0683569, mais les vitesses maximales (k_{inact}) que la réaction d'inactivation peut atteindre ont des valeurs très proches (table 4.3).

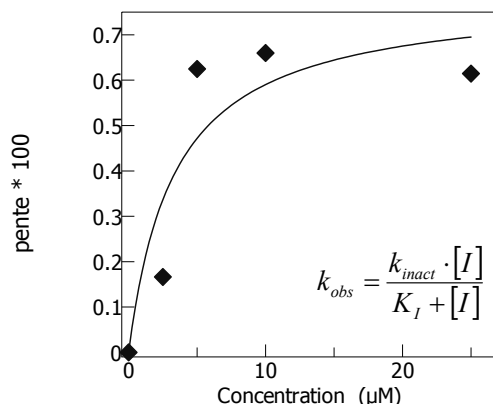


Figure 4.5 : Mesure des constantes cinétiques de la réaction d'inactivation : le graphe représente la vitesse d'inactivation (k_{obs}) en fonction de la concentration en composé RO0674274. La courbe correspond à la régression des données selon l'équation dérivée de l'équation de Michaelis-Menten.

Le fait que le composé RO0674274 provoque l'inhibition dépendante du temps moins rapidement que le RO0683569 peut être expliqué en comparant les valeurs de leur IC_{50} pour le CYP3A4. Le RO0674274 a une IC_{50} plutôt basse (2.60 μM) par rapport à l'autre composé (>50 μM). C'est donc un inhibiteur compétitif notablement plus fort sur le CYP3A4. En conséquence la formation des métabolites et donc du (des) métabolite(s) réactif(s) du RO0674274 est ralenti à cause de l'inhibition compétitive du CYP3A4. Ce problème n'est pas présent dans le cas du RO0683569, qui n'est pas un inhibiteur réversible du CYP3A4 ($IC_{50} > 50 \mu M$) et donc qui ne ralentit pas la réaction de sa propre transformation en métabolites réactifs.

	RO0674274 (2.5 μM)	RO0683569 (25 μM)
NADPH (-)	55	74
NADPH (+)	14	7

Table 4.2 : Comparaison des activités résiduelles du CYP3A4 après 40 minutes de pré-incubation avec les composés sous analyse, en présence et en absence de système régénérateur de NADPH. Les activités sont exprimées comme pourcentages de l'activité du contrôle (sans inhibiteur) au temps zéro de la pré-incubation. Les valeurs rapportées sont les valeurs moyennes de deux mesures.

	RO0674274	RO0683569
K_i (μM)	5.6	6.3
k_{inact} (min^{-1})	0.041	0.074

Table 4.3 : Constants cinétiques du processus d'inactivation du CYP3A4. Les valeurs rapportées sont les valeurs moyennes de deux mesures.

4.1.c Détermination de la TDI en présence de GSH

L'expérience de détermination de la TDI sur le CYP3A4 a été effectuée aussi en présence de glutathion (GSH) à la concentration de 10 mM.

Les durées de pré-incubation sont encore reprises de celles déjà utilisés pour l'expérience précédente : 0, 10, 20, 40 minutes.

Les résultats de l'expérience sont présentés en table 4.4. Les valeurs de l'activité résiduelle aux différents temps de pré-incubation, en présence de GSH, sont légèrement plus hautes que les valeurs obtenues en absence d'agent piégeant. Pourtant, la présence du GSH ne suffit pas pour éviter l'inactivation suicide. Le GSH est un composé nucléophile, capable de lier des molécules électrophiles (comme les intermédiaires réactives) en solution dans le mélange d'incubation, mais on admet qu'il est trop hydrophile et trop volumineux pour rentrer dans le site actif du CYP3A4. Donc, il est nécessaire que les métabolites réactifs sortent du site actif du cytochrome P450 pour être piégés par le glutathion. Dans le processus de l'inhibition suicide, les intermédiaires produits par le cytochrome P450 sont tellement réactifs qu'ils se lient au CYP3A4 avant pouvoir sortir du site actif. La présence de GSH ne peut donc pas protéger le cytochrome P450 de l'inactivation, car elle a lieu directement dans le site actif de l'enzyme, auquel le GSH n'a pas accès.

	RO0674274 (25 μM)		RO0683569 (25 μM)	
	0 min	40 min	0 min	40 min
GSH (+) 10 mM	40	10	84	7
GSH (-)	40	19	78	2

Table 4.4 : Valeurs d'activité résiduelle au temps zéro et après 40 minutes de pré-incubation avec les deux composés sous analyse en présence ou absence de GSH 10 mM. Les valeurs rapportées sont les valeurs moyennes de deux mesures.

4.1.d Détermination de la TDI en présence de kétoconazole

Le kétoconazole est un médicament utilisé comme fongicide pour le traitement des mycoses chez l'homme (Odds, 1980). Il est connu soit comme inhibiteur réversible, soit comme substrat du CYP3A4 (Rendic, 2002). Le kétoconazole a été additionné au mélange d'incubation du CYP3A4 avec l'inhibiteur suicide et le système régénérateur de NADPH à trois concentrations différentes (section 7.5) pour souligner sa capacité à protéger le cytochrome P450 de l'inactivation. Les concentrations de kétoconazole choisies sont proches des valeurs de son IC_{20} , de son IC_{50} et de son IC_{80} , pour le CYP3A4. L'expérience a été effectuée en utilisant la méthode de la pré-incubation puis mesure de la fluorescence (substrat BFC) comme indicateur de l'activité résiduelle du CYP3A4. Les résultats montrent que le cytochrome P450 est protégé de l'inhibition dépendante du temps en présence de kétoconazole. En fait, l'activité résiduelle du CYP3A4 reste constante pour chaque temps de pré-incubation. Le kétoconazole a occupé le site actif du CYP3A4 en compétition avec les composés analysés, donc les composés n'ont pas pu agir comme inhibiteurs dépendants du temps. L'inhibition provoquée par le kétoconazole est d'autant plus forte que la concentration utilisée est haute (figure 4.6), et donc que la capacité de métabolisation du CYP3A4 est basse.

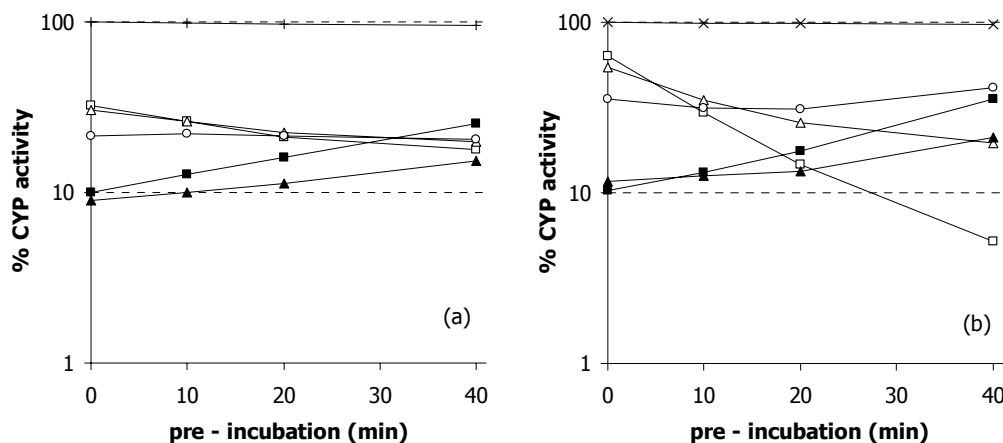


Figure 4.6 : Graphiques représentant l'inhibition du CYP3A4 par les deux composés sous analyse en présence de différentes concentrations de kétoconazole. (a) RO0674274 (+ DMSO - sans kétoconazole, ■ DMSO - kétoconazole 0.35 μM, □ RO 25 μM - no kétoconazole, Δ RO 25 μM - kétoconazole 0.01 μM, ○ RO 25 μM - kétoconazole 0.06 μM, ▲ RO 25 μM - kétoconazole 0.35 μM) et (b) RO0683569 (× DMSO - sans kétoconazole, ■ DMSO - kétoconazole 0.35 μM, □ RO 125 μM -sans kétoconazole, Δ RO 125 μM - kétoconazole 0.01 μM, ○ RO 125 μM - kétoconazole 0.06 μM, ▲ RO 125 μM - kétoconazole 0.35 μM) en présence de différentes concentrations de kétoconazole.

La protection du cytochrome P450 de l'inhibition dépendante du temps par un substrat, est une des caractéristiques principales des inhibiteurs suicides, qui est satisfaite par les deux composés analysés dans cette thèse.

4.2 Études avec les dérivés radioactifs des composés

4.2.a Détermination de la liaison covalente aux cytochromes P450.

La confirmation que l'inhibition du CYP3A4 par les deux composés sous analyse est due à une liaison covalente des métabolites réactifs sur le cytochrome P450, a été obtenue par incubation des substances avec le CYP3A4 et analyse de la fraction protéique. On a incubé les dérivés radioactifs des composés (marqués avec le ^{14}C ; figure 4.1) à la concentration de 10 μM , soit avec le CYP3A4 soit avec les microsomes de foie humain, et le système régénérateur de NADPH. Les nombreux rinçages (avec différents solvants) de la fraction protéique précipitée au MeOH après l'incubation, ont été nécessaires pour éliminer les composés attachés aux cytochromes P450 par des liaisons faibles ou non spécifiques.

On a mesuré la radioactivité liée à la fraction protéique après les rinçages et on a montré que la radioactivité liée augmentait avec la durée d'incubation. Il y a donc une dépendance en fonction du temps, non seulement de la perte d'activité du CYP3A4, mais aussi de la liaison covalente des métabolites réactifs à la fraction protéique. Cette augmentation de la liaison covalente en fonction du temps a été démontrée d'une part pour le CYP3A4 recombinant, et d'autre part pour les microsomes de foie humain.

L'incubation a été aussi réalisée en absence du système régénérateur du NADPH, et les échantillons ont été traités selon la même procédure : la radioactivité détectée liée aux protéines se situait au niveau du bruit de fond. Donc le NADPH est nécessaire pour provoquer la perte d'activité enzymatique mais aussi pour provoquer la liaison covalente des métabolites réactifs au CYP3A4. La dépendance de l'inhibition du NADPH est une importante caractéristique des inhibiteurs suicides, qui agissent après transformation en composés réactifs par le cytochrome P450, qui a besoin de NADPH pour fonctionner.

L'expérience a été aussi effectuée en présence de GSH à différentes concentrations (0, 5, 10, 20, 50 mM). Les résultats montrent que la présence d'un agent piégeant dans le mélange d'incubation provoque une diminution drastique de la quantité de radioactivité liée aux cytochromes P450. En fait, une partie des métabolites réactifs qui arrivent à sortir du site actif du cytochrome P450, en absence de GSH, peuvent se lier au CYP3A4 hors du site actif et aux autres protéines microsomales. Mais, quand un agent piégeant est ajouté dans le mélange d'incubation,

il peut piéger les métabolites réactifs qui sortent du site actif et empêcher leur liaison aux protéines.

Donc la quantité des intermédiaires réactifs liées aux cytochromes P450 est beaucoup plus basse en présence de GSH (figure 4.7). En augmentant la concentration de GSH dans le mélange d'incubation, la quantité de métabolites réactifs liés aux cytochromes P450 diminue, de façon plus graduelle pour le composé RO0674274 et plus accentuée pour le RO0683569.

4.2.b Détermination de la stœchiométrie de liaison au CYP3A4

La stœchiométrie de liaison de chaque composé au CYP3A4 pour obtenir l'inactivation complète a été déterminée par incubation du cytochrome P450 avec les composés marqués avec le ^{14}C , suivie par la mesure de l'activité résiduelle aux différents temps d'incubation et mesure de la quantité de radioactivité liée aux protéines aux mêmes temps d'incubation.

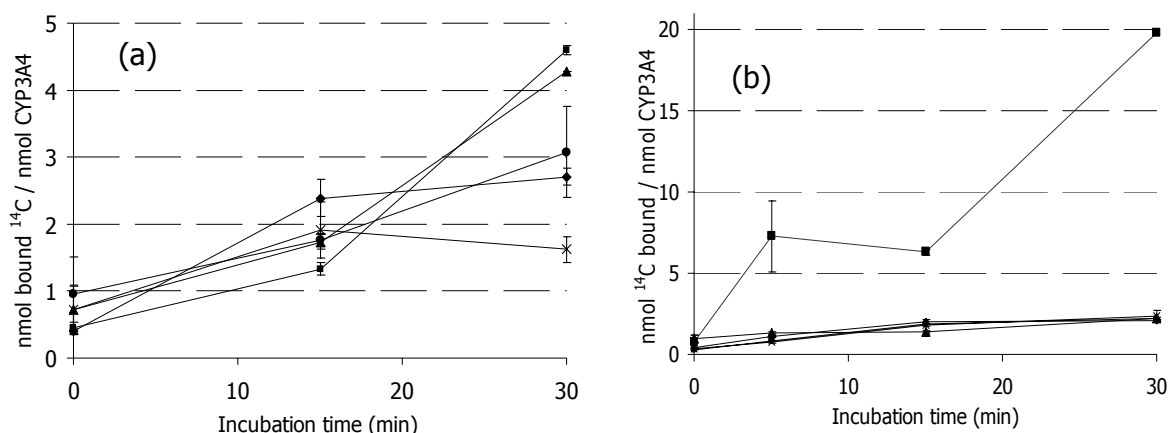


Figure 4.7 : Graphiques de l'augmentation de la radioactivité liée au CYP3A4 pendant l'incubation avec les composés sous analyse marqués avec le ^{14}C , en présence de concentrations variables de GSH. (a) RO0674274 et (b) RO0683569 ont été incubés en absence de GSH (■), ou en présence de GSH en concentration de 5 mM (◆), 10 mM (▲), 20 mM (●) et 50 mM (×). Pour le composé RO0674274 la diminution de la quantité de métabolite liée au CYP3A4 est beaucoup plus graduelle que dans le cas du composé RO0683569, en augmentant la concentration de GSH dans le mélange de réaction. Les points représentés dans les graphiques sont les valeurs moyennes de trois mesures (\pm erreur standard).

L'expérience a été effectuée soit en présence que en absence de système régénérateur de NADPH, et soit en présence que en absence de GSH (10 mM).

La stoechiométrie de liaison de 1 : 1 pour avoir la perte complète de l'activité enzymatique est un signal de la présence d'inhibition suicide : le métabolite réactif ne sort pas du site actif du cytochrome P450, mais il se lie directement à l'enzyme et cette liaison cause l'inactivation. Donc une seule molécule d'inhibiteur liée au cytochrome P450 suffit pour l'inactiver.

Les résultats des expériences d'estimation de la stoechiométrie de liaison covalente sont résumés en table 4.5. Les résultats sont exprimés comme les valeurs moyennes (\pm erreur standard) de trois déterminations.

En absence du système régénérateur de NADPH, on n'observe aucune liaison covalente entre les composés et les protéines microsomales, comme déjà souligné dans les expériences précédentes. En présence du système régénérateur de NADPH, mais en absence de GSH dans le mélange de réaction, la stoechiométrie de liaison été comprise entre 1 : 4 et 1 : 5, pour les deux composés, pour inhiber totalement l'activité du CYP3A4. Quand on effectue l'incubation du CYP3A4 avec chacun des deux composés en présence de système régénérateur et de GSH, la stoechiométrie de liaison entre le CYP3A4 et les métabolites réactifs est environ de 1 : 1 (figure 4.8). Sur les graphiques en figure 4.8, chaque point représente la valeur moyenne de trois mesures (les barres d'erreur ne sont pas indiquées pour clarté). Les résultats calculés de ces graphiques (des valeurs moyennes des 3 mesures) ne sont pas très différents des données indiquées en table 4.5, qui sont les moyennes de 3 résultats : la stoechiométrie de liaison résulte de 4.2 (sans GSH) et de 1.3 (avec GSH) molécules de RO0674274 pour chaque molécule de CYP3A4, et de 4.5 (sans GSH)

	RO0674274	RO0683569
GSH (+) 10 mM	1.5 \pm 0.5	1.2 \pm 0.1
GSH (-)	4.4 \pm 1.0	4.6 \pm 0.9

Table 4.5 : Résumé des résultats des expériences pour la détermination de la stoechiométrie de liaison entre les composés analysés et le CYP3A4. Les résultats sont exprimés comme le nombre des molécules liées à chaque molécule de cytochrome P450, en présence et en absence de GSH 10 mM dans le mélange d'incubation. Les résultats rapportés sont les valeurs moyennes (\pm erreur standard) de trois mesures.

et de 1.1 (avec GSH) molécules de RO0683569 pour chaque molécule d'enzyme.

Ce résultat est une autre indication de la nature suicide de l'inhibition du CYP3A4 due aux deux composés sous analyse, car il montre que la fixation d'une molécule de métabolite réactif suffit à inactiver l'enzyme.

4.2.c Détermination du rapport de partition (partition ratio)

Le rapport de partition (partition ratio) est défini comme le rapport entre la quantité de métabolite relâché et la quantité d'enzyme inactivé (Silverman, 1995). Il y a trois méthodes connues pour la détermination de ce rapport.

- 1) Le calcul du rapport de partition comme le rapport k_{cat}/k_{inact} ($P-1 = k_{cat}/k_{inact}$), où k_{cat} est la constante cinétique relative à la production du métabolite, et k_{inact} celle relative à la réaction d'inactivation.
- 2) Mesure de la quantité de métabolite produit (en utilisant des dérivés radioactifs) par rapport à la quantité de métabolite liée à l'enzyme.

Dans les deux cas, il est nécessaire de mesurer directement le produit de la réaction du cytochrome P450 sur l'inhibiteur suicide. Comme la méthode de détermination de l'activité

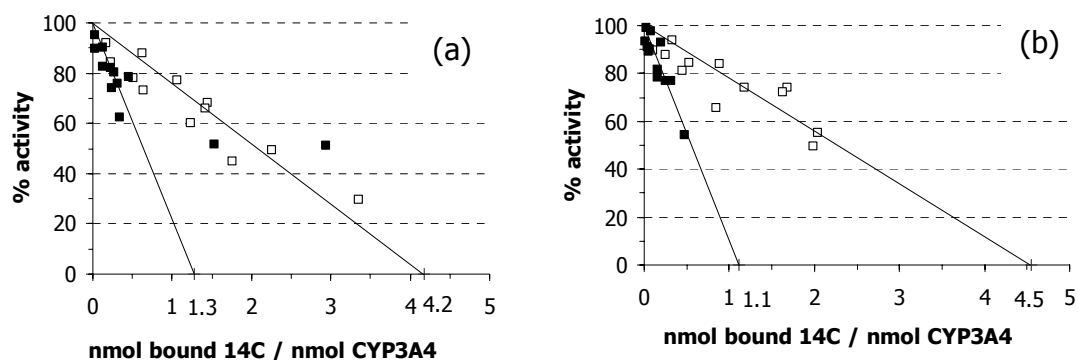


Figure 4.8 : Graphiques de la stoechiométrie de liaison entre les inhibiteurs sous analyse ((a) RO0674274 et (b) RO0683569) et le CYP3A4 pour arriver à une complète inactivation de l'activité enzymatique. La stoechiométrie de réaction a été mesurée soit en absence (□) que en présence (■) de GSH 10 mM.

Les points portés sur ces graphiques représentent les valeurs moyennes de trois mesures. Les résultats obtenus par ce mode de calcul ne sont pas très différents de ceux rapportés en table 4.5. Les barres d'erreur ne sont pas indiquées pour clarté.

enzymatique basée sur la fluorimétrie mesure la production des métabolites réactifs d'un substrat spécifique du cytochrome P450, et non la quantité d'inhibiteur métabolisé, on a déterminée le rapport de partition avec une troisième méthode.

3) Incubation du cytochrome P450 avec des concentrations d'inhibiteur de plus en plus hautes jusqu'à ce que l'activité enzymatique soit complètement inhibée. Le rapport de partition est calculé graphiquement, à partir de la représentation de l'activité résiduelle en fonction du rapport concentration d'inhibiteur sur concentration d'enzyme. L'interception de la droite d'interpolation de ces données sur l'axe des x, donne le nombre de molécules d'inhibiteur métabolisées ayant provoqué l'inactivation d'une molécule d'enzyme (P+1) et le partition ratio (P) est obtenue par différence. On a utilisé cette troisième méthode pour le calcul du rapport de partition des deux composés analysés dans cette thèse.

Après l'incubation des deux composés à plusieurs concentrations avec le CYP3A4 et le système régénérateur de NADPH pour un temps d'une heure (activité enzymatique résiduelle considérée nulle), on a mesurée la quantité de radioactivité liée au cytochrome P450.

Les graphiques utilisés pour calculer le rapport de partition (P) de chaque molécule sont rapportés en figure 4.9.

Les valeurs de partition ratio calculées avec cette méthode sont les suivantes : pour le RO0674274 : $P = 224$; pour le RO0683569 : $P = 244$.

Cette méthode de calcul fonctionne en faisant des approximations, qui pourraient expliquer des rapports de partition si élevés. Ces approximations sont les suivantes :

- ✓ On suppose que l'activité de l'enzyme pendant toute la durée de l'incubation est constante, c'est-à-dire que pour une incubation d'une heure, on considère que le cytochrome P450 en absence d'inhibiteur est stable. Mais on sait que ce n'est pas une condition vérifiée dans le cas du CYP3A4 recombinant (Gentest product data sheet), qui a une activité constante pendant 20-25 minutes.
- ✓ On considère que l'inhibition enzymatique au temps zéro de l'incubation est nulle. En autres mots, on admet que les composés sont des inhibiteurs suicides pures, sans capacité d'inhiber réversiblement le cytochrome P450. Mais on connaît l' IC_{50} des composés que l'on utilise dans cette thèse et donc on sait que au moins le RO0674274 est un inhibiteur modéré du CYP3A4.
- ✓ Troisièmement, on suppose que l'activité du CYP3A4 après une heure d'incubation en présence de l'inhibiteur suicide est effectivement nulle. Mais ceci n'est vrai qu'après une durée d'incubation infinie, donc dans des conditions idéales et pas réelles.

A cause des erreurs causées par ces approximations, on obtient des résultats surévalués pour les valeurs du rapport de partition (partition ratio). Cette méthode de calcul est, cependant, la seule utilisable puisqu'on n'a pas pu mesurer directement les quantités des métabolites des inhibiteurs produits par le cytochrome P450.

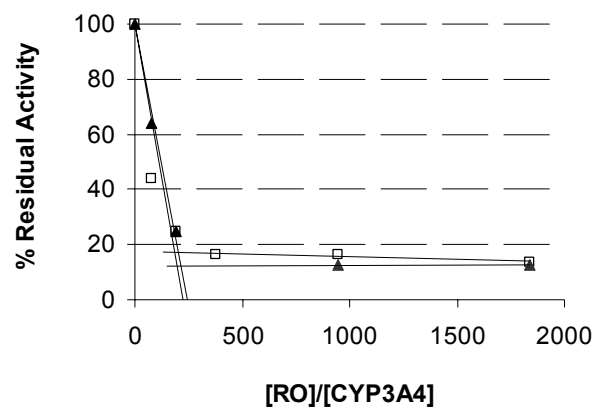


Figure 4.9 : Graphiques pour le calcul du partition ratio des deux inhibiteurs suicides sous analyse RO0683569 (▲) et RO0674274 (□).

4.3 Caractérisation des métabolites des deux inhibiteurs suicides

Les deux inhibiteurs suicides ont été incubés avec les microsomes de foie humain ou avec le CYP3A4 recombinant (en suivant la procédure décrite en section 7.9) pour identifier les métabolites responsables de l'inhibition suicide du CYP3A4. En fait, une partie des métabolites réactifs produits par les cytochromes P450, sont capables de sortir de la cavité du site actif et rester en solution dans le mélange d'incubation, ou ils peuvent être piégés par des agents nucléophiles, comme le GSH. Il est donc possible de déterminer le type de métabolites produits et éventuellement leur structure chimique exacte, par analyse LC-MS/MS, et proposer un chemin réactionnel passant par les intermédiaires réactifs à l'origine de l'inhibition suicide.

★ RO0674274

Par analyse en spectrométrie de masse (LC-MS/MS), on a identifié les mêmes produits après métabolisation de RO0674274 soit par les microsomes de foie humain soit par le CYP3A4 recombinant. En plus, quand le composé a été incubé avec des autres isoformes de cytochromes P450 (CYP2C9 ou CYP2D6 recombinants) aucun métabolite n'a été détecté. Cette observation montre que le CYP3A4 est l'isoforme responsable du métabolisme du RO0674274, qui n'est pas oxydé par les autres isoformes principales de cytochromes P450.

Le composé RO0674274 ($M=277$) donne un pic en ESI/MS à $(m+1)/z$ de 278. Par analyse MS/MS, il présente un fragment ayant $(m+1)/z = 197$, qui peut être le résultat de la perte de la partie de la molécule (de masse 80) qui contient le cycle furane (figure 4.11) ; un fragment de $(m+1)/z = 250-251$, qui correspond à la $(m+1)/z$ du composé parent moins 28 (qui pourrait correspondre à la perte d'un fragment CO ou N₂ ou CNH₂) et dont on ne connaît pas la structure ; un fragment de $(m+1)/z = 170$, qui pourrait correspondre au précédent par perte du fragment furanique (de masse 80). On trouve aussi un fragment de $(m+1)/z = 210$ et qui peut correspondre au composé parent par perte du cycle furane seul. Pourtant, on n'a aucune hypothèse sur les fragments $(m+1)/z = 158$ et 143.

Les métabolites principaux, identifiés après incubation du RO0674274 avec le CYP3A4, arrêt de la réaction enzymatique, concentration du surnageant et analyse par LC-MS/MS, sont des produits d'oxydation.

Le composé parent est encore présent en quantité très basse après une heure d'incubation.

On trouve un métabolite de $(m+1)/z = 294$, qui peut être un produit mono-oxydé. La position du groupe OH sur la molécule n'est pas clarifiée par la fragmentation de la molécule. En fait, dans les spectres de MS/MS de ce métabolite, on trouve un signal principal de $(m+1)/z = 276$

qu'indique la perte d'une molécule d'eau par le produit oxydé, et encore le signal avec une $(m+1)/z$ de 251 (figure 4.12).

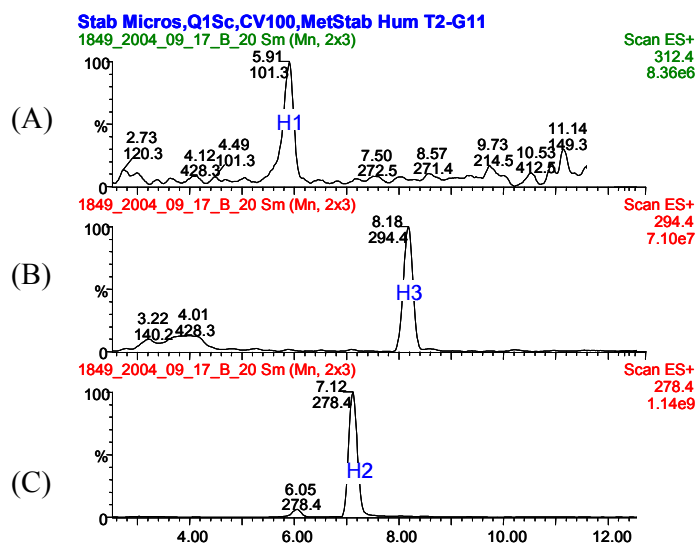


Figure 4.10 : Chromatogrammes reconstruits correspondantes au composé parent RO0674274 (temps de rétention 7.1 minutes) (C) et à ses métabolites principaux : $(m+1)/z = 312$ (temps de rétention 5.9 minutes) (A) et $(m+1)/z = 294$ (temps de rétention 8.2 minutes) (B).

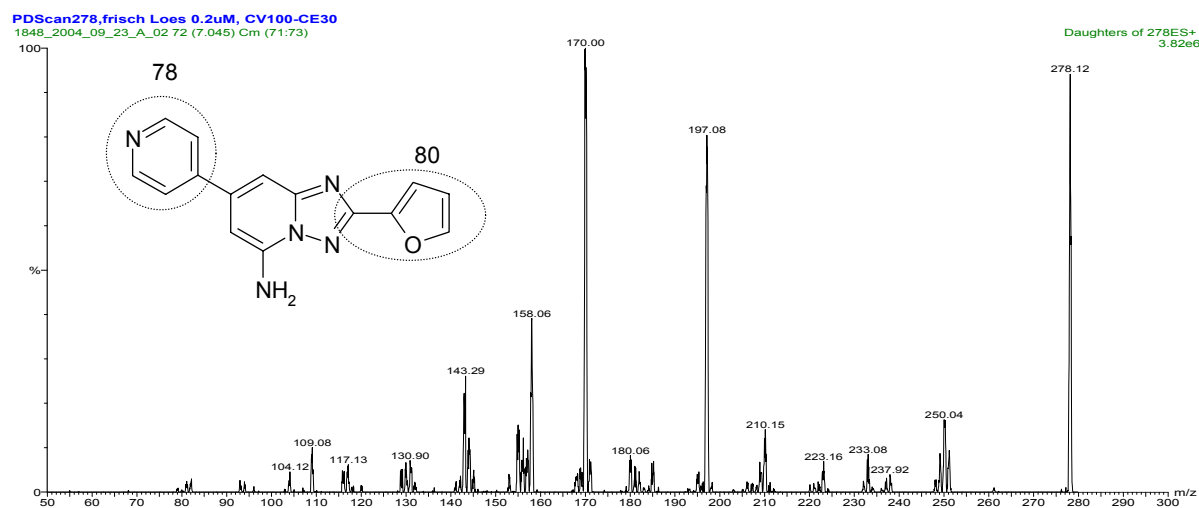


Figure 4.11 : Spectre de MS/MS du composé RO0674274 et hypothèse de fragmentation.

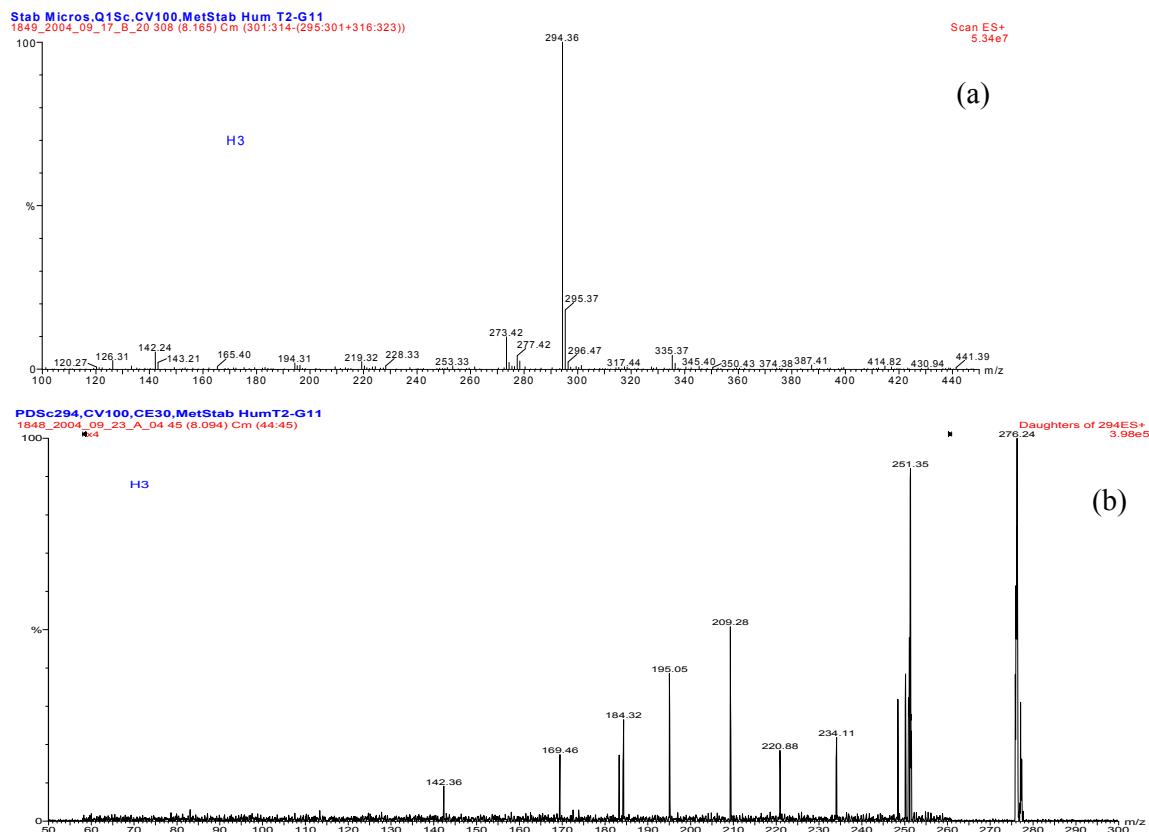


Figure 4.12 : Spectres de masse (MS (a) et MS/MS (b)) du métabolite mono-oxydé ($(m+1)/z = 294$) du composé RO0674274. On peut remarquer le signal ayant $(m+1)/z = 276$, qui correspond à ce métabolite, par perte d'une molécule d'eau.

Mais on connaît le temps de rétention de ce métabolite (figure 4.10(B)), qui est plus long par rapport au composé parent. Ceci montre que le métabolite est moins polaire du composé parent et donc il pourrait être un dérivé N-oxyde sur l'azote de la pyridine.

Un deuxième métabolite d'oxydation est le produit avec une $(m+1)/z$ de 312, qui correspond au composé parent oxydé et additionné d'une molécule d'eau. La structure de ce métabolite pourrait être soit celle d'un furan oxydé et hydraté (4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-furane), soit celle d'un dérivé ouvert (acide γ -cétocarboxylique) de l'hétérocycle à cinq atomes.

On a aussi incubé, le composé RO0674274 avec les microsomes de foie de rat et avec le CYP3A4 recombinant, en présence de GSH (5 mM) (section 7.10). Par analyse LC-MS/MS on a détecté un adduit au glutathion de $(m+1)/z = 565$ [$M + O + \text{GSH} - 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$] (figure 4.13).

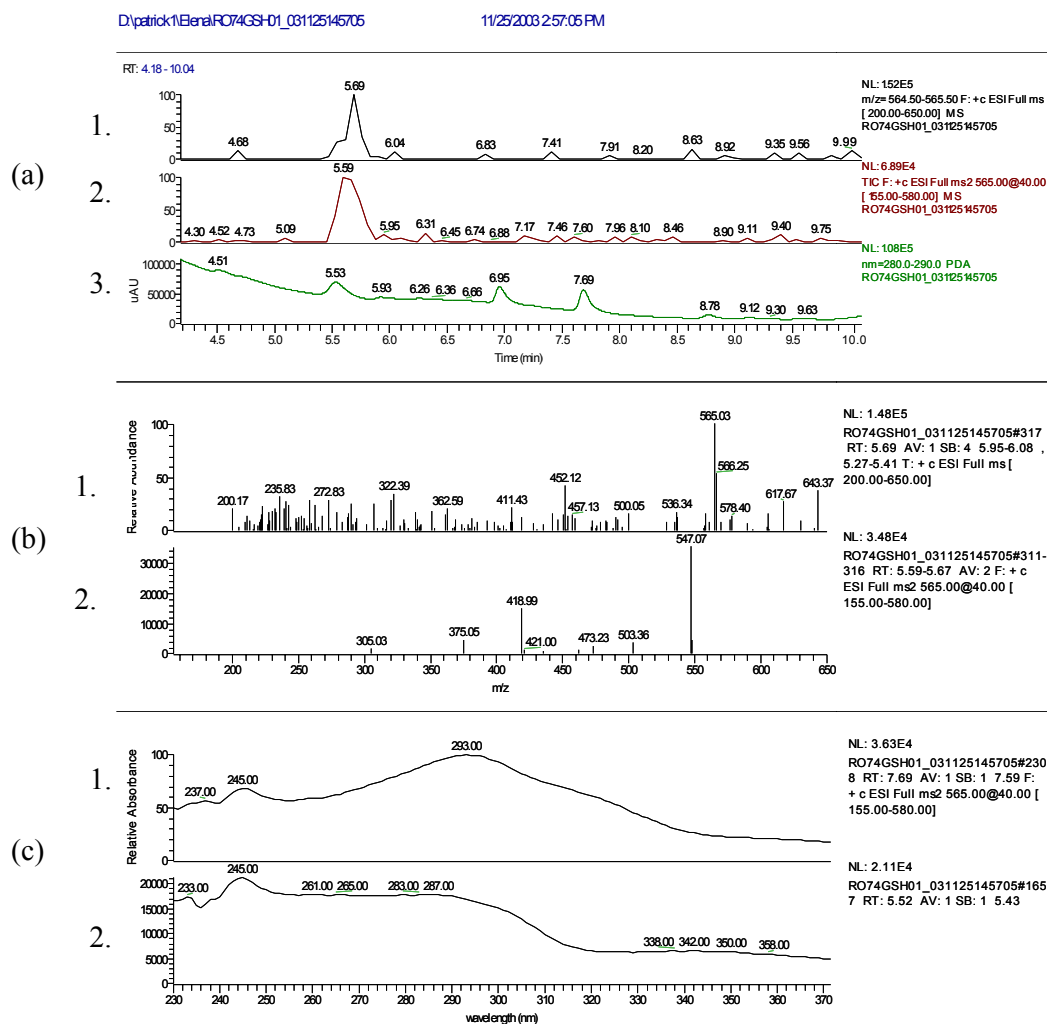


Figure 4.13 : Adduits au GSH du composé RO0674274 métabolisé par le CYP3A4 en présence de GSH (5 mM). (a) Chromatogramme reconstruit à $(m+1)/z = 565$, MS (1.), MS/MS (2.) et UV à $\lambda = 289-290$ nm (3.). (b) Spectres de masse à $(m+1)/z = 565$: MS (1.) et MS/MS (2.). Dans le spectre MS/MS les signaux principaux sont : $(m+1)/z = 547$, l'adduit au GSH après perte d'une molécule d'eau, et $(m+1)/z = 419$, l'adduit au GSH après perte d'un fragment ($M = 146$). (c) Spectres UV du produit parent (1.) et de l'adduit au GSH (2.).

Ce composé peut être le produit d'addition du GSH sur l'époxyde du furane (ou éventuellement sur le 4-oxo-2-buténaldehyde intermédiaire) ; ce produit se réarrange en pyrole, par attaque du groupe amine ($-NH_2$) du γ -glutamate du GSH et perte de deux molécules d'eau pour donner un composé bicyclique. Cette réaction a été déjà décrite pour le furane isolé (Chen, 1997 ; Peterson, 2005). En particulier le mélange d'adduits monogluthation bicycliques décrit par Peterson (2005) montre sur son spectre MS/MS une perte de 18 (H_2O) et de 146 de façon analogue au présent adduit. La présence de ce produit de métabolisation après incubation soit avec les microsomes de rat soit avec le CYP3A4, est une preuve qui soutient l'idée de la métabolisation du furane de ce composé en un produit réactif ouvert, comme décrit dans la littérature pour des autres composés furaniques (Khojasteh-Bakht, 1999 ; Baer, 2005).

Les structures des métabolites identifiés de RO0674274 sont présentées en figure 4.14.

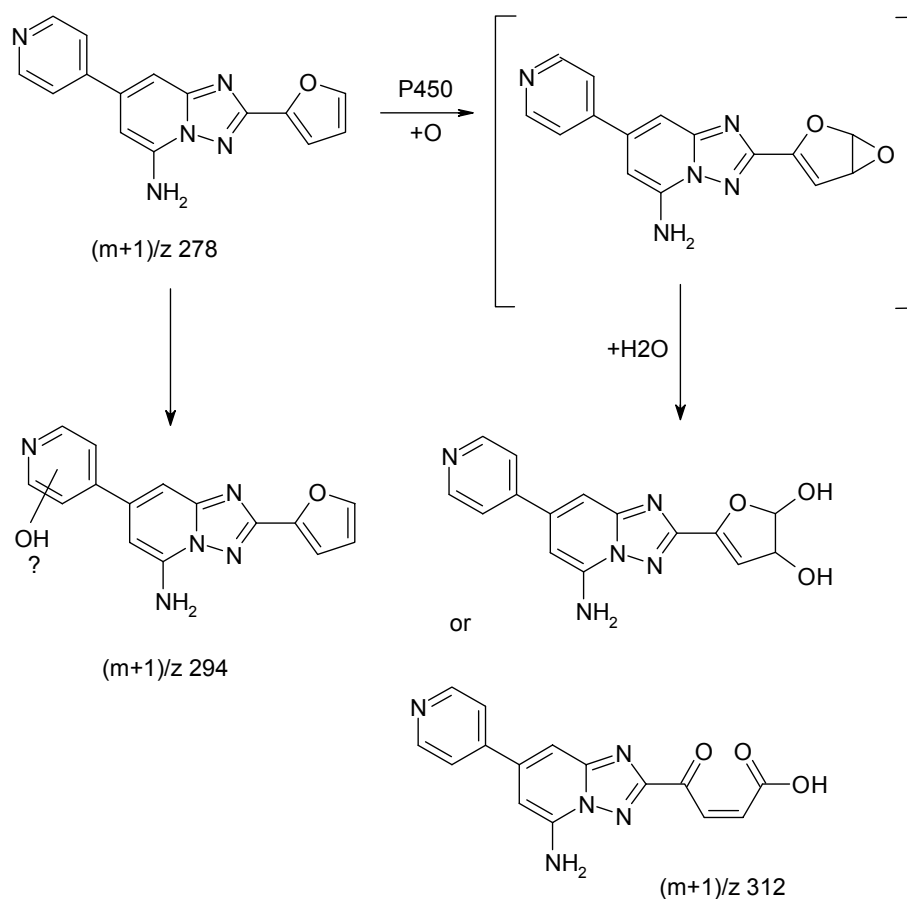


Figure 4.14 : Schéma général des métabolites du composé RO0674274. On n'a pas identifié exactement la structure du produit oxydé et hydraté : on propose les deux structures possibles de ce dérivé ayant $(m+1)/z = 312$.

★ RO0683569

De la même façon, le composé RO0683569 a été incubé d'une part avec les microsomes de foie humain et d'autre part avec le CYP3A4 recombinant, en présence de système régénérateur de NADPH (la procédure utilisée est décrite en section 7.9). On a trouvé les mêmes métabolites après incubation avec les microsomes de foie humain et avec le CYP3A4 recombinant.

Par chromatographie HPLC en ESI/MS, le composé RO0683569 ($M = 307$) donne un spectre de masse de $(m+1)/z = 308$. Le spectre MS/MS présente un fragment de $(m+1)/z = 106$, qui correspond au groupe éthyl-pyridine (figure 4.16). L'autre fragment principal a $(m+1)/z = 78$, qui correspond à la pyridine seule. On trouve aussi un fragment de $(m+1)/z = 203$, c'est-à-dire l'autre partie de la molécule qui a perdu le fragment de $(m+1)/z = 106$.

Les métabolites principaux, identifiés après incubation du RO0683569 avec le CYP3A4, arrêt de la réaction enzymatique, concentration du surnageant et analyse par LC-MS/MS, sont des produits d'oxydation. Les chromatogrammes reconstruits des produits et du composé parent sont rapportés en figure 4.15.

Le premier métabolite de $(m+1)/z = 324$, est un dérivé mono-oxydé. L'oxydation a lieu sur la partie de la molécule qui contient la pyridine et en fait, par fragmentation de cette ion moléculaire, on trouve un signal à $(m+1)/z = 122$, qui peut indiquer soit un produit oxydé sur la pyridine soit sur l'atome de carbone en position benzylique. Le fait qu'il soit moins polaire que la molécule parente est en faveur de l'oxyde de pyridine. On retrouve aussi le fragment ayant $(m+1)/z = 203$ montrant que l'autre partie de la molécule, n'est pas oxydée (figure 4.17).

Après incubation du composé RO0683569 avec les microsomes de rat et analyse LC-MS/MS, on a aussi trouvé un métabolite de même masse, $(m+1)/z = 324$, mais plus polaire que le composé parent et oxydé sur la partie de la molécule qui contient le cycle furane et la pyrimidine. En fait, on a détecté en MS/MS un fragment de $(m+1)/z = 219$, qui correspond au fragment de masse 203 + 16, donc oxydé.

Un autre métabolite beaucoup plus polaire de RO0683569 possède $(m+1)/z = 342$. Il correspond à un produit d'oxydation et addition d'une molécule d'eau. Le site du métabolisme est le fragment contenant le furane et la pyrimidine. En fait, par fragmentation de ce dérivé on trouve des signaux ayant $(m+1)/z = 106$ et 78, indiquant que la partie de la molécule avec la pyridine n'est pas oxydée. En plus, on trouve le fragment à $(m+1)/z = 219$ qui peut indiquer l'oxydation de la partie de la molécule avec le cycle furane et la pyrimidine (figure 4.18). Comme pour le composé précédent, on ne peut pas identifier la structure exacte du métabolite, qui pourrait être un furane oxydé et hydraté (4,5-dihydro-4,5-dihydroxy furane) ou un dérivé carboxylique ouvert.

En plus, pour essayer de mettre en évidence un intermédiaire réactif par piégeage avec un nucléophile, on a incubé le RO0683569 avec les microsomes de foie de rat ou avec le CYP3A4 recombinant, en présence de GSH (5 mM) (section 7.10). Par analyse LC-MS/MS on a détecté des dimères de glutathion (GSSG) de $(m+1)/z = 613$, mais étant donné que la masse du composé RO0683569 est égale à celle du glutathion, il est impossible de savoir si ces dérivés à $(m+1)/z = 613$ ne sont pas des adduits au GSH, sans faire d'expérience en spectrométrie de masse à haut résolution ou en étudiant les produits isolés par spectrométrie RMN. Par contre, un adduit au glutathion de $(m+1)/z = 595$ [$M + O + GSH - 2 \cdot H_2O$] a aussi été détecté (figure 4.19). Comme pour le composé RO0674274, cette masse à $(m+1)/z$ peut correspondre au produit bicyclique d'addition du GSH sur l'époxyde du furane, qui se réarrange en pyrole, par attaque du groupe amine ($-NH_2$) du γ -glutamate du GSH et perte de deux molécules d'eau. Donc, aussi pour ce composé on a des indications préliminaires qui soutiennent l'hypothèse de la métabolisation du furane en époxyde de furane ou alternativement en 4-oxo-2-buten-aldéhyde, l'intermédiaire décrit par Chen et Peterson (figure 4.19). A l'époque de cette étude préliminaire, antérieure à la publication récente de Peterson on n'avait pas recherché d'adduits dimériques du glutathion (masse $(m+1)/z = 1189, 1207$ ou 1225), hors de la gamme de masse utilisé (150-800).

Les métabolites mono-oxydés forment aussi des complexes de coordination avec les cations du tampon utilisé pour l'incubation : on retrouve, en fait, un adduit avec un ion Na^+ [$(m+1)/z = 346$] et un adduit avec un ion K^+ [$(m+1)/z = 362$] (figure 4.17(a)).

Les structures des métabolites identifiés de RO0683569 sont présentées en figure 4.20 et le schéma de formation des adduits au glutathion en figure 4.21.

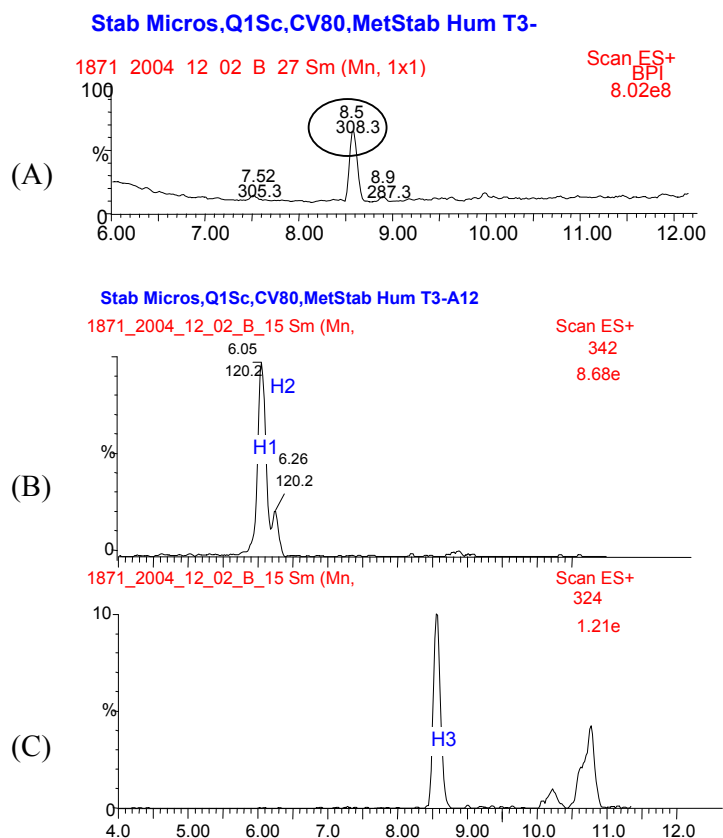


Figure 4.15 : Chromatogrammes reconstruits correspondants au composé parent RO0683569 (temps de rétention 8.6 minutes) (A) et aux métabolites principaux identifiés : (B) produit oxydé et hydraté avec $(m+1)/z = 342$; (C) produit mono-oxydé de $(m+1)/z = 324$.

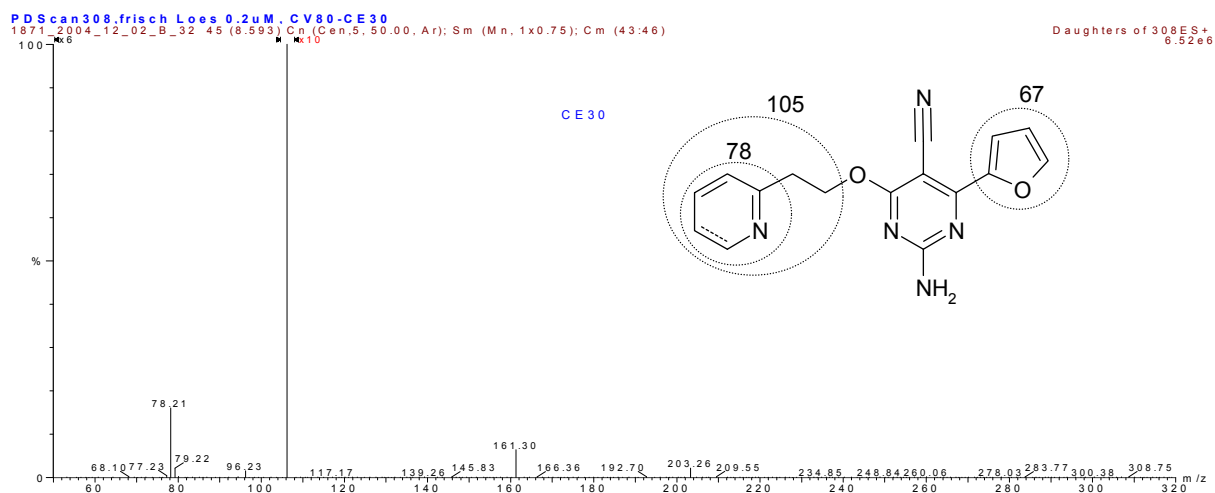


Figure 4.16 : Spectre de MS/MS du composé RO0683569 et hypothèse de fragmentation.

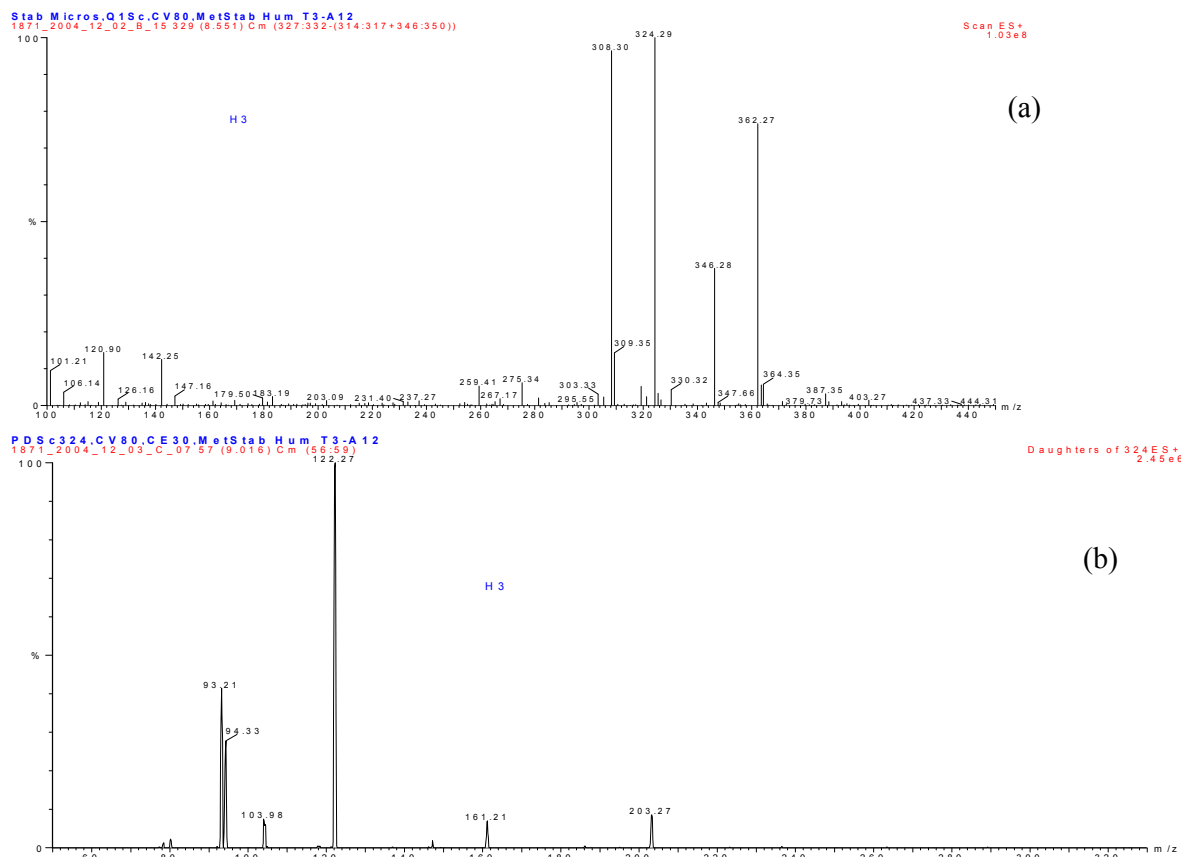


Figure 4.17 : Spectres de masse (MS (a) et MS/MS (b)) du métabolite mono-oxydé ($(m+1)/z = 324$) du composé RO0683569. Sur le spectre (a) on peut remarquer aussi les adduits de ce métabolite avec des ions présents dans le tampon d'incubation : le sodium ($(m+1)/z = 346$) et le potassium ($(m+1)/z = 362$). Sur le spectre de MS/MS à 324 (b) le fragment principal est ce de la partie pyridinique oxydée de la molécule ayant $(m+1)/z = 122$.

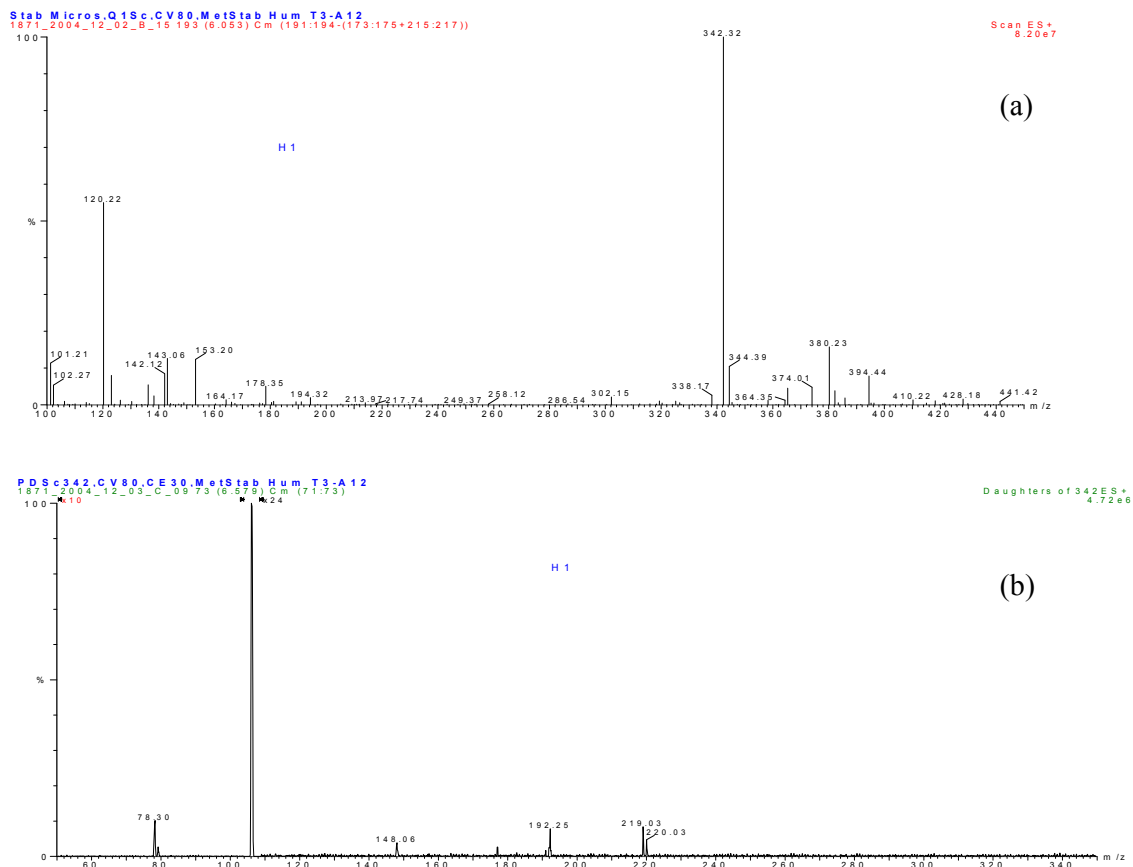


Figure 4.18 : Spectres de masse (MS (a) et MS/MS (b)) du métabolite oxydé et hydraté ($(m+1)/z = 342$) du composé RO0683569. Sur le spectre (b) on peut remarquer les fragments de $(m+1)/z = 106$ et $(m+1)/z = 78$, qui indiquent que l'oxydation de la molécule a eu lieu sur la partie de la molécule contenant le cycle furane et la pyrimidine.

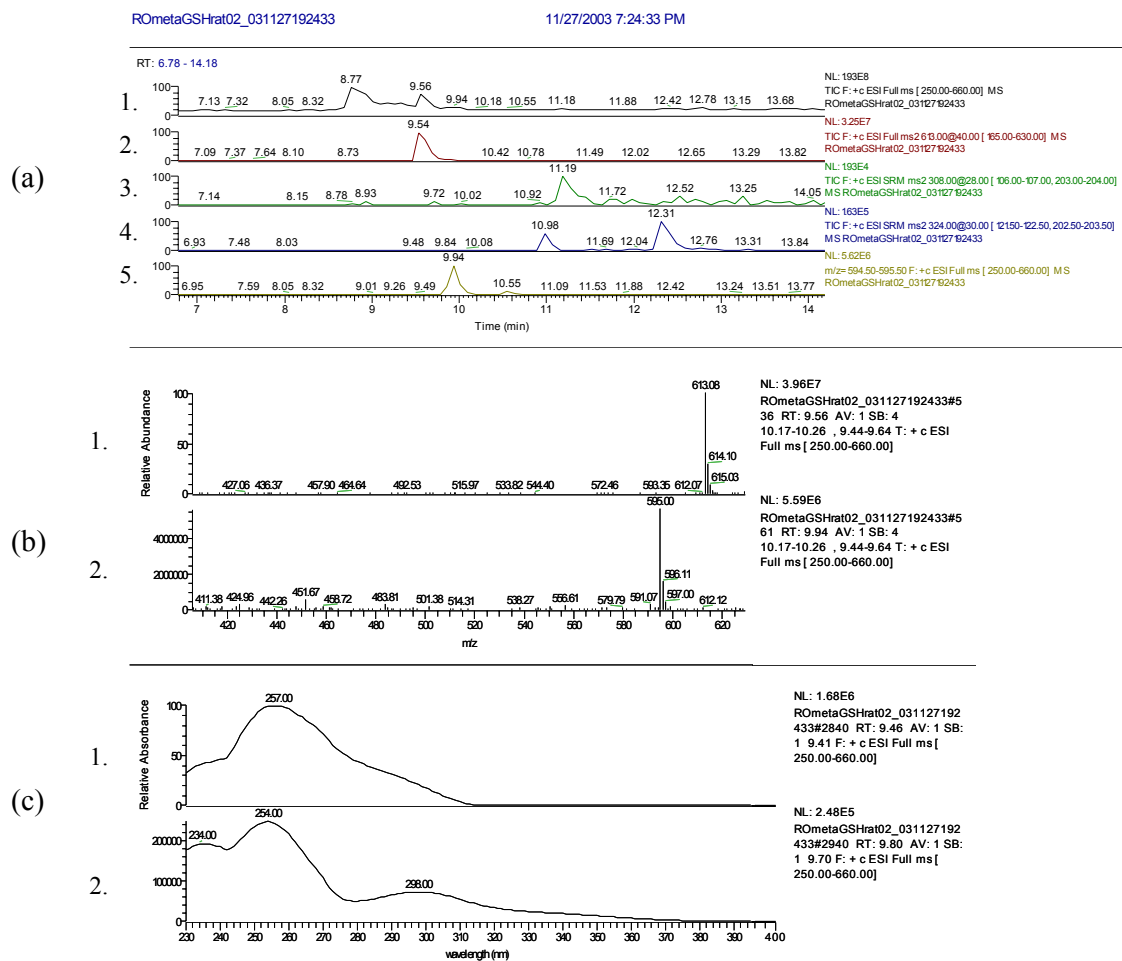


Figure 4.19 : Métabolites du composé RO0683569 après incubation avec microsomes de rat en présence de GSH (5 mM). (a) Chromatogrammes reconstruits (1.) MS, full scan ; (2.) MS/MS à $(m+1)/z = 613$; (3.) MS/MS à $(m+1)/z = 308$; (4.) MS/MS à $(m+1)/z = 324$; (5.) MS à $(m+1)/z = 595$. (b) Spectres MS (1.) du dimère GSSG à $(m+1)/z = 613$; (2.) de l'adduit du GSH à $(m+1)/z = 595$. (c) Spectres UV (1.) du dimère de glutathion (ou adduit au glutathion) et (2.) du produit bicyclique de piégeage par le GSH.

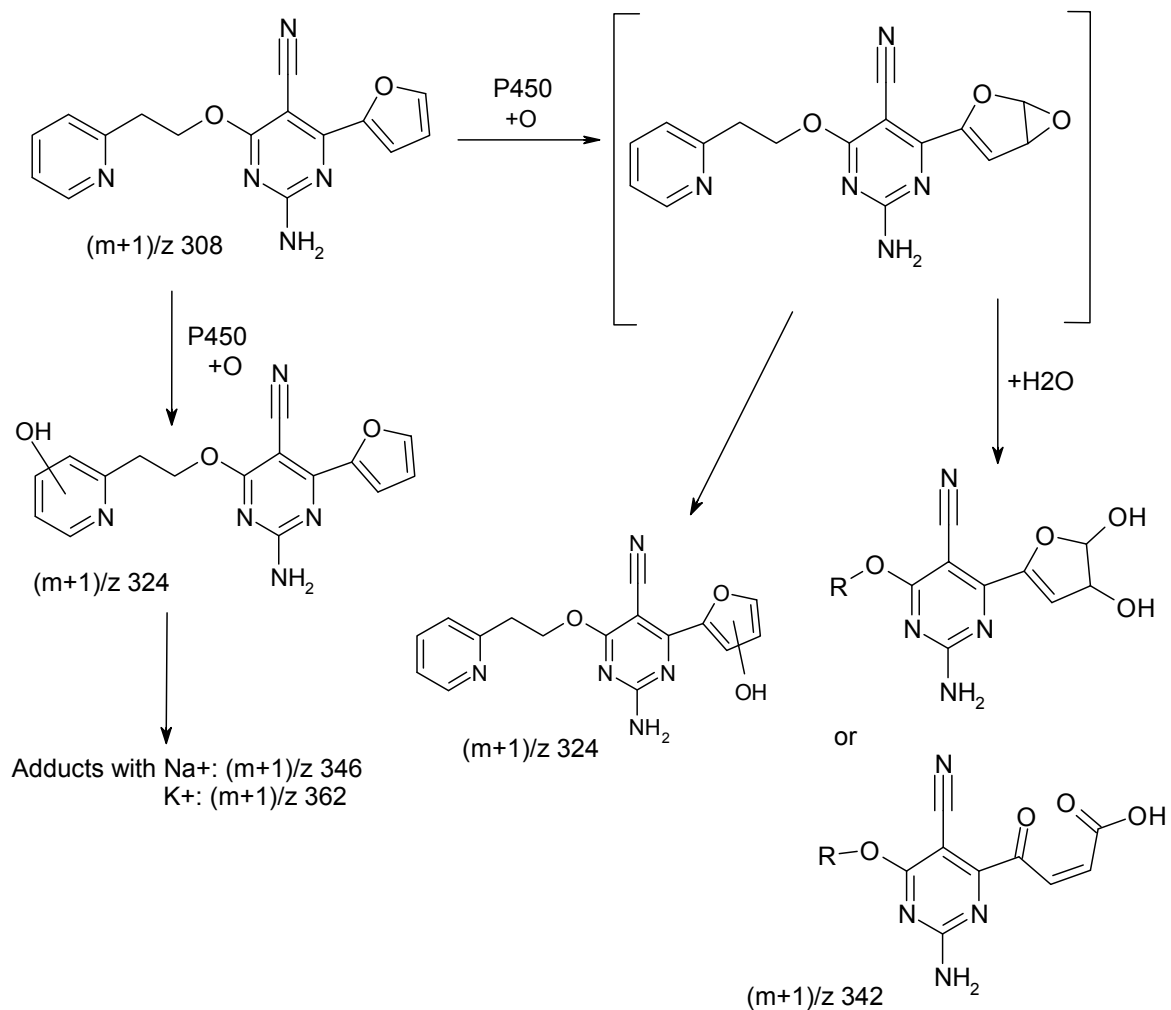


Figure 4.20 : Schéma général des métabolites du composé RO0683569. On n'a pas identifié exactement la structure du produit oxydé et hydraté : on propose les deux structures possibles de ce dérivé ayant $(m+1)/z = 342$.

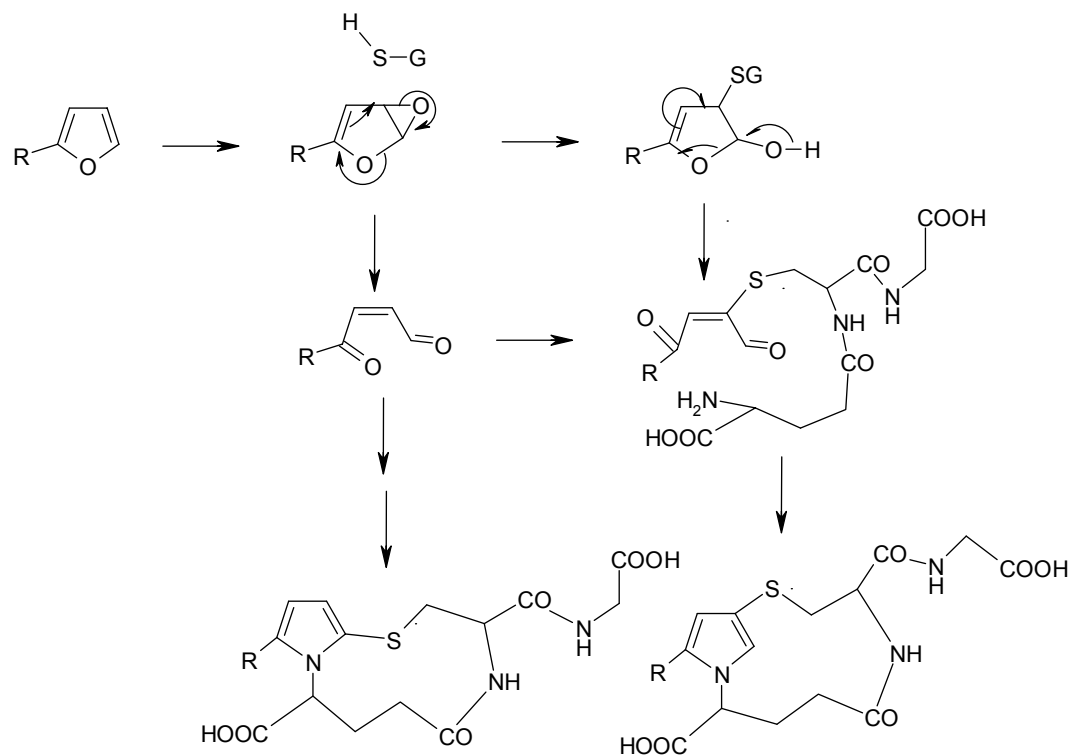


Figure 4.21 : Schéma de la formation des adduits au glutathion au cours de l'activation métabolique des furanes selon Peterson et Kojasteh-Bakht (Kojasteh-Bakht, 1999 ; Peterson, 2005).

4.4 Application de la nouvelle méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps (TDI) pour une étude de relations structure-activité (SAR)

La nouvelle méthode de détermination de la TDI, validée sur le CYP3A4, a été employée pour tester l'effet inhibiteur suicide d'une classe de composés, afin de déterminer des relations structure-activité (SAR).

La série des molécules choisies (des antagonistes du récepteur humain A_{2a} pour l'adénosine), possède la structure générale présentée en figure 4.22 avec différents substituants sur le furane. Le furane est une des sous-structures bien connues pour être métabolisées en intermédiaires réactifs qui peuvent se lier de façon covalente aux protéines microsomales (Ravindranath, 1984), comme on a aussi montré dans les sections précédentes ce chapitre.

Donc pour protéger les cytochromes P450 de l'inhibition suicide, plusieurs dérivés ont été synthétisés, avec différents substituants sur le noyau furane. Tous les composés utilisés dans cette étude de SAR ont été synthétisés chez le département de Discovery – Medicinal Chemistry (PRBD-CM) de Hoffmann-La Roche.

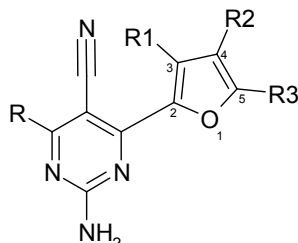


Figure 4.22 : Structure générale de la classe des composés utilisés pour les études de SAR, en appliquant la nouvelle méthode de détermination des constantes de la réaction de la TDI. L'étude a évalué en particulier l'influence des substituents sur le furane (R1, R2, R3) sur la puissance de l'inhibition suicide.

La classe de composés prise en considération pour cette analyse SAR, présente des groupes substituants soit d'encombrement stérique variable, soit qui changent la densité électronique sur l'hétérocycle. On a déterminées l'IC₅₀, K_I et k_{inact} pour tous ces composés ; les résultats sont résumés en table 4.6.

On peut déduire des considérations concernant l'influence des substituants du furane sur la capacité des composés sous analyse de provoquer TDI sur le CYP3A4.

Un certain nombre de composés testés ont la même efficacité suicide que la molécule avec le furane non substitué (k_{inact}/K_I environ 8*10⁻⁴). Certains substituants sur le noyau furane perturbent peu l'affinité pour le CYP3A4 (K_I), ou la cinétique du processus d'inactivation (k_{inact}). Ce sont, par exemple, le groupe CN (R3) en position 5 (composé 11) ou un atome de brome (R2) en position 4 (composé 16) (table 3.13).

Au contraire, les groupes méthyles augmentent l'efficacité des composés comme inhibiteurs suicides du CYP3A4, et cette augmentation dépend de la position des méthyles sur le furane. En fait, un méthyle en position 3 (R1) (composé 2), augmente l'efficacité d'inactivation environ de deux fois par rapport au composé 1. Le même méthyle, en position 5 (R3) (composé 3) augmente la capacité de provoquer la TDI d'environ 7 fois ; la molécule avec le furane méthylé en position 4 (composé 4) est un inhibiteur dépendant du temps 16 fois plus fort que le composé 1. Ces variations de l'efficacité d'inhibition sont dues principalement à l'augmentation de l'affinité des

composés pour la CYP3A4. La K_i est le paramètre qui subit le plus remarquable changement (diminution jusqu'à 10 fois), par contre la k_{inact} maintient une valeur dans le même ordre de grandeur par rapport au composé avec le furane non substitué. Donc, dans ce cas, le groupe méthyle augmente l'efficacité des inhibiteurs dépendant du temps principalement par augmentation de l'affinité des composés pour le CYP3A4.

Les substituants avec le plus grand degré d'encombrement stérique ont la capacité de protéger le CYP3A4 de l'inhibition suicide. Un atome de brome en position 5 (composé 17) peut diminuer l'efficacité d'inhibition de ces composés ; de même, le benzène condensé sur le furane en positions 4-5 (composé 19) et le groupe $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-Ph}$ en position 5 (composé 18) provoquent une diminution de 10 fois de l'efficacité de l'inhibition dépendante du temps.

Malheureusement, pour cette classe de composés, l'addition de substituants encombrants sur le furane cause une perte d'affinité et de sélectivité pour le récepteur A_{2a} et donc il n'est pas possible d'utiliser des molécules ainsi modifiées comme nouveaux composés thérapeutiques potentiels.

En conclusion, en utilisant la nouvelle méthode de détermination de la TDI on peut facilement et rapidement évaluer la capacité des composés comme inhibiteurs dépendants du temps, et obtenir des résultats quantitatifs. Ceci permet d'effectuer une comparaison entre différents composés d'une classe et de définir des relations structure activité (SAR). Une analyse des relations structure-TDI des classes des composés peut être très utile pour mettre en évidence les points faibles des molécules et aider à concevoir des nouvelles molécules thérapeutiques en évitant ou en modifiant les groupes à la source d'inhibition suicide.

Ce travail de développement, validation et application de la nouvelle méthode de détermination de la TDI sur une classe de composés a été présenté comme poster (attaché à la fin de ce chapitre) au Congrès EUFEPS 2004 (Bruxelles, 17-20 Octobre '04) et l'abstract a été publié sur le supplément de l'European Journal of Pharmaceutical Sciences. (Vol. 23 ; Abstract nr. PO-97).

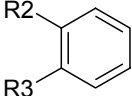
	R1	R2	R3	IC ₅₀ (μM)	K _I (μM)	k _{inact} (min ⁻¹)	k _{inact} / K _I (*10 ⁻⁴)
1				51	49	0.094	19.3
2	-CH ₃			22	15	0.074	49.1
3			-CH ₃	18	5	0.069	138
4		-CH ₃		4	6	0.163	272
5			-CH ₂ -F	11	5	0.035	69.1
6			-S-CH ₃	17	15	0.094	62.9
7			-Cl	>50	14	0.044	31.2
8			-CH ₂ -Br	20	41	0.122	29.8
9			-O-CH ₃	>50	18	0.048	26.9
10			-CH ₂ -O-CH ₃	>50	8	0.032	40.3
11			-CN	>100	19	0.028	14.5
12			-CH ₂ -OH	26	52	0.078	15.1
13			-CH ₂ -N-(CH ₃) ₂	>50	22	0.032	14.7
14		-CN		>50	22	0.021	9.42
15			-CHF ₂	>50	37	0.032	8.71
16		-Br		33	30	0.060	20.0
17			-Br	>50	43	0.037	8.57
18			-CH ₂ -O-CH ₂ -Ph	>100	117	0.023	1.97
19				>50	37	0.016	4.36

Table 4.6 : Résumé des résultats de l'étude de SAR sur une classe de composés antagonistes du récepteur A_{2a}. Les valeurs indiquées sont l'IC₅₀, la K_I et k_{inact} et le rapport entre ces deux derniers paramètres, qui donne un indice de la puissance de la TDI.

In vitro approaches to detect time dependent inhibition of CYPs in early drug discovery: a case study

Roche

Elena Fontana¹, Vittorio Bona¹, Stephen Fowler³, Thomas Hartung⁴, Roger Norcross², Claus Riemer², Sonia Poli^{*1}
F. Hoffmann-La Roche Ltd., Pharmaceutical Research, ¹Discovery DMPK, ²Discovery Chemistry, ³Non-Clinical Development, CH-4070 Basel, Switzerland
* Current address: ADME-PK Department, Adnex Pharmaceuticals SA, CH-1228 Plan-les-Ouates GE, Switzerland

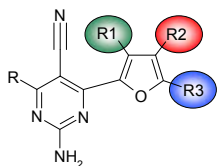
INTRODUCTION

Mechanism-Based Inhibition: Metabolism of drugs by Cytochromes P450 can lead to the formation of reactive metabolites, which can irreversibly bind to the metabolizing enzyme. (a)

- Consequences:**
- Serious drug-drug interactions
 - Auto-immune response against modified proteins

It is thus important to screen for time dependent inhibition in the early stages of drug discovery in order to avoid development of drugs which will show adverse events in patients.

Mechanism-based inhibition of a series of hA_{2a} receptor antagonists has been investigated on CYP3A4. They have general formula:



In vitro tests (1)

Human liver microsomes incubation to determine metabolic stability (HPLC/UV analysis).

Results: no metabolite could be detected, although the parent compound had totally disappeared after incubation in the presence of NADPH.

In vitro tests (2)

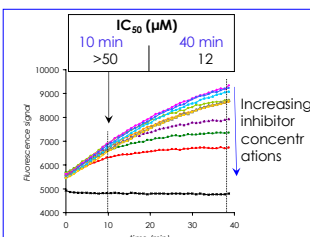
IC₅₀ determination in high throughput mode, using a fluorimetric assay. (c)
The test was performed on five commonly screened CYP isoforms.

Results:

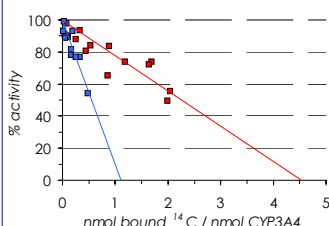
IC ₅₀ (μM)				
3A4	1A2	2C9	2C19	2D6
>50	10.7	>50	5.13	>50

Apparently, there are no major concerns regarding CYP inhibition.

Though, observation of the kinetics of BFC online, allows for immediate spotting of **time dependent inhibition**.



Studies using ¹⁴C labelled compound

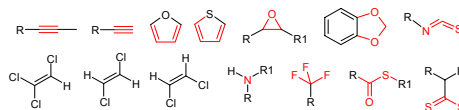


nmol bound ¹⁴C / nmol CYP3A4 (residual activity = 0)

Without GSH	With GSH
4.6	1.2
Partition Ratio = 16 ± 7	

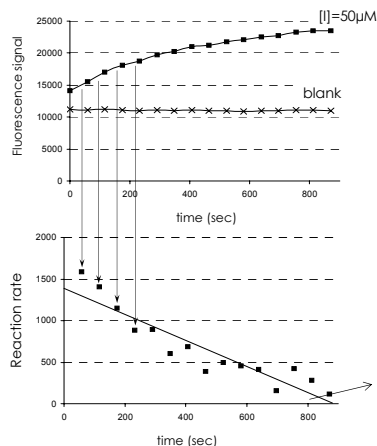
Problem: ¹⁴C labelled compounds are generally unavailable in early discovery, thus such studies cannot be performed on a series of compounds.

Typical structures responsible for suicide inhibition (b)

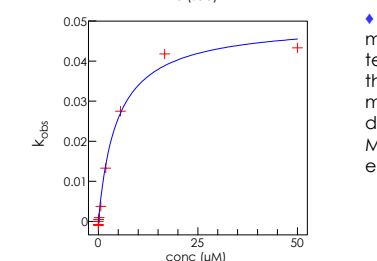


When one of these groups is present in a compound structure, time dependent inhibition is likely to occur

Development of a HT assay for TDI



Minor modifications to the assay for IC₅₀ determination (c)



From the kinetic measurements, a new template calculates the reaction rates every minute and fits the data into a Michaelis-Menten derived equation:

$$k_{obs} = \frac{k_{inact} \cdot [I]}{K_i + [I]}$$

Method Validation

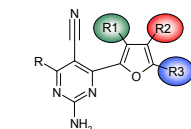
Compound	K _i (μM)		k _{inact} (min ⁻¹)		k _{inact} /K _i	
	HT TDI (BFC)	TDI (MDZ)	HT TDI (BFC)	TDI (MDZ)	HT TDI (BFC)	TDI (MDZ)
Diltiazem	5.0	0.5	0.010	0.030	0.002	0.060
Erythromycin	25	4.0	0.075	0.060	0.003	0.015
Ethinylestradiol	15	24	0.055	0.150	0.004	0.006
Saquinavir	1.8	2.4	0.032	0.030	0.017	0.013
Verapamil	2.0	9	0.039	0.130	0.019	0.014
Gestodene	2.1	7.2	0.049	0.120	0.023	0.017
Troleandomycin	1.4	0.6	0.069	0.050	0.051	0.083
Mifepristone	0.6	1.5	0.033	0.070	0.056	0.047

General good agreement with classical procedures

Implementation of HT assay to reduce liabilities in a chemical class

K_i and k_{inact} determined for 18 diverse compounds

R1	R2	R3	IC ₅₀ - μM	K _i - μM	k _{inact} - min ⁻¹	K _{inact} /K _i
			51	49	0.041	8.2E-04
-CH ₃			22	15	0.032	2.0E-03
	-CH ₃		18	5	0.030	5.5E-03
	CH ₃		4	6	0.071	1.3E-02
	-CH ₂ -F		11	5	0.015	3.2E-03
	-S-CH ₃		17	15	0.041	2.8E-03
	-Cl		>50	14	0.019	1.4E-03
	-CH ₂ -Br		20	41	0.053	1.3E-03
	-O-CH ₃		>50	18	0.021	1.2E-03
	-CH ₂ -O-CH ₃		>50	8	0.014	1.9E-03
	-CN		>100	19	0.012	6.5E-04
	-CH ₂ -OH		26	52	0.034	6.5E-04
	CH ₂ -N-(CH ₃) ₂		>50	22	0.014	6.3E-04
	-CN		>50	22	0.009	3.9E-04
	-CHF ₂		>50	37	0.014	3.9E-04
	-Br		33	30	0.026	8.5E-04
	-Br		>50	43	0.016	3.7E-04
	-CH ₂ -O-CH ₂ -Ph		>100	117	0.010	8.5E-05
			>50	37	0.007	1.9E-04



-CH₃ groups increase efficiency of suicide inhibition, mainly because of increased affinity

Some substituents are inefficient in protecting from suicide inactivation

Steric hindrance protects from suicide inhibition, reducing the efficiency of the catalytic step

Introduce substituents which may minimise inactivation of CYP3A4

- Substituents with different degrees of steric hindrance
- Change electron density on the furan ring

CONCLUSIONS

- We have developed a solid and reproducible assay for quantitative assessment of time dependent inhibition (TDI)
- K_i and k_{inact} generation in High Throughput mode
- The method is highly comparable to more classical procedures
- Applications of the new method will allow programs to screen for TDI and to make SAR analysis

References

- Murray M. (1997) Clinical & Experimental Pharmacology and Physiology 24: 465-470
- Guengerich F.P. (2001) Chemical Research in Toxicology 14(6): 611-650
- Crespi C. L., Miller V.P., et al. (1997) Analytical Biochemistry 248(1): 188-190

5. Discussion

5. Discussion

L'inhibition suicide des cytochromes P450 consiste dans l'activation métabolique d'un composé, c'est-à-dire dans sa transformation en un intermédiaire réactif et dans la formation d'un complexe stable métabolite-enzyme. Souvent cette interaction cytochrome P450-métabolite réactif est sous forme de liaison covalente et les conséquences peuvent être d'un côté des graves interactions médicamenteuses, et d'un autre côté l'initiation d'une réponse autoimmunitaire. Il est donc très important d'éviter de développer de nouvelles molécules thérapeutiques contenant des structures chimiques qui provoquent l'inhibition suicide. Il est également important de détecter les inhibiteurs suicides le plus précocement possible dans le processus de développement des nouveaux médicaments, bien avant l'entrée des nouvelles molécules dans les phases du développement clinique.

5.1 Revue de littérature

La réalisation d'une revue de littérature et d'une base de données sur les inhibiteurs suicides (« mechanism-based inhibitors ») permet de créer un outil sur lequel s'appuyer pour la conception de nouveaux médicaments. C'est la première étape d'une stratégie de design et développement de molécules thérapeutiques plus sûres pour les patients.

Dans la littérature jusqu'en mai 2005 on n'a trouvé aucune revue complète sur l'inhibition suicide des cytochromes P450 humains, bien qu'il existe de nombreuses revues sur différents aspects de ce sujet. On a trouvé des revues sur la réactivité des cytochromes P450 (Guengerich, 2001), d'autres focalisées sur le CYP3A4 – qui est néanmoins le plus important enzyme métabolique du foie humain –, sur les médicaments déjà dans le commerce ou sur les substances d'origine végétale (Dresser, 2000 ; Zhou, 2004a ; Zhou, 2004b ; Zhou, 2005) ; d'autres revues sont ciblées sur les mécanismes d'inactivation des cytochromes P450 par des molécules thérapeutiques (Murray, 1997). D'autres publications sont plus générales et concernent les mécanismes enzymatiques de l'inhibition suicide (Walsh, 1982), ou les cinétiques enzymatiques de l'inactivation elle-même (Waley, 1980 ; Waley, 1985). Nombreuses sont aussi les publications et les revues sur les conséquences de l'inhibition (soit réversible, soit suicide) des différentes isoformes des cytochromes P450 sur la pharmacocinétique des molécules : les interactions médicamenteuses et l'hépatite autoimmunitaire (Guengerich, 1997 ; Lin, 1998).

Cette revue présente un résumé général des informations principales concernant les inhibiteurs suicides. Elle comprend tous les composés chimiques décrits, d'origine naturelle ou de synthèse, capable de provoquer l'inhibition suicide. Dans la revue on a compilé les inhibiteurs suicides connus de toutes les isoformes des cytochromes P450, sans se limiter aux cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ou aux isoformes humaines (Polasek, 2004 ; Zhou, 2005). Bien que dans le design et développement des molécules thérapeutiques les préoccupations majeures concernent les cytochromes P450 humains, il peut être intéressant de prendre en considération aussi les inhibiteurs des cytochromes P450 appartenant à différentes espèces animales (souris, rat, lapin, chien, différents poissons, insectes et autres). En fait, dans la littérature on retrouve plusieurs exemples des composés capables d'inhiber les cytochromes P450 animaux, qui ont aussi la capacité de provoquer l'inhibition suicide d'isoformes humaines. Un exemple est la phencyclidine, dont la capacité d'inhibition suicide a été découverte sur le CYP2B1 de rat (Sharma, 1997), mais études ultérieures ont montré que c'est aussi un inhibiteur suicide du CYP2C9 humain (Chun, 2000). Un autre exemple est le 17- α -éthynylestradiol, un composé souvent utilisée dans les pilules contraceptives et contenant un acétylène terminal. Les premières études sur cette molécule montraient sa capacité de provoquer l'inhibition suicide du CYP2B6 humain (Mills, 1999) mais plus tard on a démontré qu'il peut inactiver aussi le CYP2B1 de rat (Kent, 2002). D'autres exemples de substances qui inhibent aussi bien les cytochromes P450 humains qu'animaux, sont l' α -naphtoflavone, capable d'inhiber le CYP3A4 humain et le CYP3A6 de lapin (Boek-Dohalska, 2001) ; le composé L-739,010 – un inhibiteur de la 5-lipoxygénase, un enzyme impliqué dans la synthèse des eicosanoïdes (Borgeat, 1976) – qui est un inhibiteur suicide de la famille des CYP3A chez l'homme, le chien, le rat et le singe (Zhang, 1996).

On a créé une base de données en format électronique ISIS/Base, dans laquelle on a organisé toutes les informations pour décrire les inhibiteurs suicides retrouvées dans la littérature scientifique. Cette base de données permet la recherche des inhibiteurs suicides par différents critères :

- le nom, ou une partie du nom ;
- l'isoforme ou une des isoformes inhibées ;
- l'espèce dont les isoformes (ou une des isoformes) inhibées appartiennent ;
- la référence bibliographique, ou une partie de la référence (par exemple le nom de l'auteur ou l'année de publication) où on a trouvé les données sur la molécule ;

→ la structure chimique exacte ou une sous-structure.

Les recherches dans la base de données peuvent être effectuées avec une grande flexibilité, ce qui permet de les adapter aux nécessités d'utilisateurs très différents. La flexibilité de la recherche des données fait de la banque de données un instrument utile pour les chimistes impliqués dans la conception de nouvelles molécules thérapeutiques. En pratique, il est possible de vérifier, pour une quelconque sous-structure, si dans la littérature, il existe une molécule qui provoque l'inhibition suicide d'une ou plusieurs isoformes de cytochromes P450, et qui contient la même sous-structure chimique.

Dans la revue on a d'ailleurs résumé les structures chimiques le plus fréquemment responsables de l'inhibition suicide des cytochromes P450 et les principales réactions métaboliques que les molécules subissent dans leur transformation en intermédiaires réactifs, première étape de l'inhibition suicide.

La présence, dans une nouvelle molécule, d'une sous-structure qui est indiquée dans la base de données comme responsable de l'inhibition suicide des cytochromes P450, ne signifie naturellement pas que le nouveau composé soit forcément lui aussi un inhibiteur suicide. Une molécule est métabolisée par une isoforme de cytochrome P450 en un métabolite réactif en fonction de sa structure globale – qui détermine l'affinité du composé pour l'enzyme catalytique – et de l'accessibilité du groupe potentiellement dangereux au centre réactionnel (atome de fer de la porphyrine) du cytochrome P450. En fait, il y a un grand nombre de composés, soit naturels soit de synthèse, qui contiennent des groupements théoriquement capables de provoquer l'inhibition suicide des cytochromes P450, mais qui ne donnent aucune inactivation. Des exemples de composés avec un groupe à risque et qui ne provoquent aucune inactivation, sont la fluoxétine, qui ne provoque aucune inhibition suicide sur le CYP2C8 (Polasek, 2004), bien qu'elle ait une amine tertiaire qui pourrait être transformée après déalkylation et oxydation en un dérivé nitroso et donner une liaison de coordination très stable avec l'atome de fer du cytochrome P450 ; ou les benzodioxoles, composés qui sont capables de former des complexes métabolite-intermédiaire (« metabolite-intermediate complexes »), mais qui ont une sélectivité et une affinité pour les différentes isoformes des cytochromes P450 qui dépendent de la chaîne latérale de la molécule (Nakajima, 1999). Un exemple de composé qui contient un cycle furane et qui ne provoque pas l'inhibition suicide des CYP1A2, CYP2D6 et CYP3A4, est la ranitidine, un médicament anti-ulcéreux (Shinn, 1992 ; Martinez, 1999). Par ailleurs, de très nombreux composés potentiellement inhibiteurs suicides n'ont jamais été étudiés.

Donc, la revue et surtout la base de données sont des instruments qui peuvent être très utiles, bien qu'ils ne donnent pas des directives exactes et certaines, mais plutôt des indications pour éviter, dans les nouveaux composés, les structures qui provoquent l'inhibition suicide. L'utilisation de la base de données peut servir à donner des alertes structurales, fournir l'indication des sous-structures « à risque », et révéler des molécules présentant ces groupements chimiques. Ces molécules nécessiteront des investigations supplémentaires pour s'assurer qu'elles ne provoquent pas d'inhibition suicide des principales isoformes des cytochromes P450, et donc permettre d'éviter des conséquences dangereuses pour les patients.

5.2 Nouvelle méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps (TDI)

Quand un composé présente une sous-structure capable de provoquer l'inhibition suicide des cytochromes P450, il est conseillé d'effectuer des tests spécifiques pour vérifier si effectivement la molécule est un inhibiteur suicide.

Le test concernant l'inhibition compétitive, le couramment effectué, est le test de détermination de l'IC₅₀ ; dans notre laboratoire on mesure ce paramètre en utilisant la méthode basée sur la fluorimétrie (Section 3.2.b) et dérivée de la méthode décrite par Crespi (Crespi, 1997 ; Crespi, 2000). L'IC₅₀ est un paramètre qui décrit quantitativement l'inhibition compétitive et qui représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour inhiber le 50% de l'activité de l'enzyme. La valeur de l'IC₅₀ des inhibiteurs compétitifs reste constante en fonction du temps et pendant l'intervalle de linéarité de l'activité enzymatique, comme conséquence de la définition d'inhibiteur compétitif.

Si on détermine l'IC₅₀ d'un inhibiteur compétitif, comme par exemple le kétoconazole (pour le CYP3A4), avec la méthode basée sur la fluorescence et utilisant comme substrat la BFC (section 3.2.b), on obtient des valeurs variant peu en fonction du temps. En fait, l'IC₅₀ du kétoconazole est de $0.042 \pm 0.0054 \mu\text{M}$ après 2 minutes d'incubation, de $0.063 \pm 0.0049 \mu\text{M}$ après 10 minutes d'incubation et de $0.057 \pm 0.0046 \mu\text{M}$ le long d'une cinétique de 16 minutes. Les valeurs indiquées sont les moyennes \pm erreur standard (n=5). Ces résultats sont analogues à ceux d'études publiées dans la littérature (par exemple : Naritomi, 2004).

Dans le cas d'une inhibition suicide, au contraire, on observe une augmentation de l'efficacité d'inhibition au cours du temps, donc une diminution de la valeur de l'IC₅₀ : l'inhibiteur suicide bloque irréversiblement l'activité du cytochrome P450 et par conséquent la quantité d'inhibiteur nécessaire pour inhiber la moitié de cette activité enzymatique diminue. La détermination de la valeur de l'IC₅₀ au début et à la fin d'une mesure cinétique de l'activité du cytochrome P450 est

une méthode simple et rapide pour obtenir une première indication de la capacité d'un composé de provoquer l'inhibition suicide.

La mesure de l' IC_{50} d'un composé sur une isoforme de cytochrome P450 sans pré-incubation et après un temps de pré-incubation a été déjà indiquée comme une méthode à haut débit pour la détection de l'inhibition dépendante du temps (Yamamoto, 2003 ; Yamamoto, 2004 ; Naritomi, 2004). La limite de cette méthode est que la variation de la valeur de l' IC_{50} en fonction du temps dépend de nombreux facteurs expérimentaux et peut varier considérablement. Donc la constatation d'une diminution de l' IC_{50} en fonction du temps donne une indication qualitative sur la possibilité d'inactivation suicide, mais aucune indication quantitative sur leur puissance d'inactivation.

Pourtant, la comparaison des efficacités d'inhibition de composés différents permettrait de déduire des relations structure-activité (structure-inhibition suicide) parmi les molécules d'une même famille. C'est pourquoi il est nécessaire d'obtenir des données quantitatives concernant l'inhibition dépendante du temps.

Les méthodes plus traditionnelles de détermination de l'inhibition suicide des cytochromes P450 sont basées sur l'incubation des microsomes humains ou des enzymes recombinants avec des substrats spécifiques, suivie par l'analyse HPLC-uv ou LC-MS/MS (Yin, 2000 ; Walsky, 2004) pour la quantification des métabolites spécifiques. Ces méthodes comprennent souvent aussi une étape intermédiaire de dilution du mélange de pré-incubation, une étape qui vise à souligner la présence d'une liaison covalente (ou une liaison de coordination très stable) entre l'inactivateur et le cytochrome P450 et à diminuer l'effet d'inhibition compétitive. Bien qu'actuellement ce type de méthode soit largement automatisé et bien que les incubations soient effectuées sur des plaques à 96 puits, ces tests consomment beaucoup de temps et de réactifs (en particulier d'enzyme).

Ainsi dans le passé deux types de méthode de détermination de l'inhibition suicide ont été préconisées, basées sur le même principe de la pré-incubation, mais avec modes de détection différents : un à haut débit, mais qui fournit seulement des données qualitatifs (fluorescence – BFC) ; l'autre à bas débit, qui donne des résultats quantitatifs mais qui nécessite de quantités de réactifs considérables et de beaucoup de temps (LC-MS/MS).

Avec la nouvelle méthode présentée dans cette thèse, on a réussi à combiner les avantages des méthodes basées sur la mesure de la fluorescence (substrat BFC) comme indice de l'activité catalytique des cytochromes P450, et les avantages des méthodes avec une partie analytique plus importante et des résultats quantitatifs.

L'avantage de cette méthode est qu'elle consiste simplement en un traitement mathématique, qui utilise les données du test de détermination de l'IC₅₀ d'une façon différente, afin de calculer les constantes cinétiques de la réaction d'inactivation : la K_I et la k_{inact} . Ainsi à partir des données brutes d'une même expérience, on peut calculer l'IC₅₀, et – en cas d'inhibition suicide – estimer les paramètres qui décrivent la réaction d'inactivation. Les conséquences principales sont la rapidité d'exécution des essais, la faible quantité de réactifs nécessaire, la facilité dans l'utilisation du programme électronique de calcul. De plus, les résultats obtenus sont quantitatifs, (les constantes cinétiques K_I et k_{inact}), ce qui permet de les utiliser pour comparer les efficacités d'inhibition de différents composés.

Les inconvénients principaux de la nouvelle méthode sont liés à l'extrême simplification de la partie expérimentale. En fait, l'inhibition dépendante du temps n'est pas déterminée après une pré-incubation et dilution du mélange d'incubation, donc on n'obtient aucune information spécifique concernant le type de liaison entre l'inhibiteur et le cytochrome P450. Au contraire, avec la méthode traditionnelle de pré-incubation et dilution, il y a plus de certitude sur la nature covalente (ou de toute forme très stable) de la liaison inhibiteur-cytochrome P450. La nouvelle méthode ne permet pas de préciser le type de liaison ou de mécanisme qui est à l'origine de l'inhibition dépendante du temps : on ne peut pas distinguer entre inhibition suicide, inhibition réversible lente et forte, ou la métabolisation de l'inhibiteur en dérivés inhibiteurs réversibles mais plus efficaces que le composé parent.

Grâce à la nouvelle méthode de calcul on obtient les paramètres cinétiques de la réaction d'inactivation des cytochromes P450 avec facilité et rapidité, ce qui permet de définir d'une façon quantitative la puissance d'inhibition dépendante du temps de plusieurs composés au même temps.

Cette caractéristique a permis d'accumuler des données suffisantes pour déduire des relations structure-activité (structure-inhibition dépendante du temps) (SAR) d'une famille de composés inhibiteurs du récepteur A_{2a} pour l'adénosine. Les molécules qui ont montré la plus grande affinité et la meilleure sélectivité pour ce récepteur ont toutes un groupement furane dans leur structure chimique (Jacob-Roetne, 1999 ; Poucher, 1995 ; Zocchi, 1996). Mais le furane est aussi une des sous-structures les plus fréquemment indiquées dans la base des données (et donc dans la littérature) comme responsables de l'inhibition suicide des cytochromes P450.

Les composés inhibiteurs du récepteur A_{2a} considérés pour cette analyse SAR, ont été synthétisés avec des substituents différents sur le cycle du furane, afin d'augmenter l'encombrement stérique et réduire l'accès de cette structure potentiellement dangereuse au centre catalytique du

cytochrome P450. Par comparaison des constantes d'inactivation des composés testés sur le CYP3A4, on a déduit des relations structure-inhibition suicide.

Le composé dont le cycle furane est non substitué est un inhibiteur dépendant du temps d'efficacité modérée.

Les dérivés substitués par des groupements méthyles sur le furane ont une puissance d'inhibition suicide de deux à 16 fois plus forte que le composé non substitué suivant la position de substitution sur le cycle. L'augmentation de l'efficacité est due principalement à l'augmentation de l'affinité des composés pour le CYP3A4 (la valeur de la K_I diminue). Donc, la substitution sur le furane avec des groupements méthyles ne protège pas le CYP3A4 de l'inhibition dépendante du temps, au contraire, elle la favorise.

Le cytochrome P450 n'est pas non plus protégé de l'inhibition suicide avec des autres substituants sur le furane (comme par exemple le groupement CN) qui n'ont aucune influence sur l'efficacité d'inactivation (K_I et k_{inact} ont des valeurs très proches à celles de la molécule avec le furane non substitué).

Seuls les substituants avec le plus haut degré d'encombrement stérique sont capables de protéger efficacement le cytochrome P450 de l'inactivation (la valeur de la K_I augmente et celle de la k_{inact} diminue notablement).

L'étude des relations structure-inhibition dépendante du temps réalisée dans cette thèse est une étude rétrospective : toutes les composés de la série analysée avaient déjà été éliminés de l'ensemble des composés en développement. En fait, il avait été déjà démontré que la substitution sur le furane avec des groupements fortement encombrants provoque une diminution drastique de l'affinité et de la sélectivité pour le récepteur A_{2a} (surtout en rapport au récepteur A_1).

En conclusion, grâce à cette nouvelle méthode de détermination quantitative de l'inhibition dépendante du temps, on a donc la possibilité de calculer les constantes cinétiques (K_I et k_{inact}) de la réaction d'inactivation des cytochromes P450 de façon simple et rapide, ce qui permet de tester nombreux composés en parallèle et d'obtenir des résultats quantitatifs pour un nombre considérable de molécules. Cet avantage peut se traduire dans une analyse de l'inhibition dépendante du temps de classes de composés, et dans l'établissement de relations structure-activité pour ce type d'inhibition. Les résultats peuvent être utilisés par les pharmaco-chimistes pour l'amélioration des composés en développement, car ils peuvent fournir des idées pour trouver des solutions aux éventuels problèmes d'inhibition suicide.

5.3 Études sur deux composés Roche et leur activité comme inhibiteurs suicides

Dans ce travail de thèse, on a étudié le métabolisme de deux molécules Roche, des inhibiteurs des récepteurs A_{2a} de l'adénosine, qui présentent un cycle furane non substitué dans leur structure chimique.

En considération des observations suivantes :

- ⇒ les principales responsables du métabolisme du furane sont les cytochromes P450 et ce cycle est une des sous-structures les plus souvent indiquées comme responsables de l'inhibition suicide ;
- ⇒ le fait qu'un composé provoque l'inhibition dépendante du temps (TDI) sur une isoforme de cytochrome P450 ne prouve pas que ce composé est effectivement un inhibiteur suicide, car la dépendance du temps est seulement une des caractéristiques typiques des inhibiteurs suicides.

C'est pourquoi nous avons effectué une série d'expériences pour démontrer que les deux composés Roche sont des inhibiteurs suicides des cytochromes P450.

Les premiers tests de fluorescence sur l'inhibition de cinq isoformes des cytochromes P450 montrent que les deux composés ont une activité comme inhibiteurs dépendants du temps uniquement sur le CYP3A4, et un des deux molécules (RO0674274) est aussi un inhibiteur réversible et de puissance modérée (IC₅₀ = 2.60 µM) de cette isoforme. Les expériences ultérieures effectuées avec les deux composés sur le CYP3A4, montrent qu'ils sont bien des inhibiteurs suicides de cette isoforme, car ils satisfont les réquisits fondamentaux des inhibiteurs suicides (« mechanism-based » inhibitors) (Silvermann, 1995) :

- ☆ l'inhibition du CYP3A4 dépend du temps, et les valeurs des constantes de la réaction d'inactivation montrent que les deux composés ont une efficacité d'inhibition modérée ;
- ☆ l'inhibition dépend de la présence du système régénérateur de NADPH dans le mélange d'incubation ;
- ☆ la présence de GSH (un agent piégeant, qui contient un atome de soufre nucléophile) dans le mélange d'incubation n'évite pas l'inhibition suicide du CYP3A4 ;
- ☆ la présence d'un inhibiteur et substrat avec une bonne affinité pour le CYP3A4, le kétoconazole, protège cette isoforme de cytochrome P450 de l'inhibition suicide ;
- ☆ on observe la formation d'une liaison stable (non réversible après nombreux rinçages avec solvants différents) d'une quantité croissante de métabolites réactifs sur le CYP3A4

- en fonction du temps ; la quantité de métabolites liés au CYP3A4 est mesurée par comptage de la radioactivité liée (composés marqués avec le ^{14}C) ;
- ☆ la stœchiométrie de liaison entre CYP3A4 et les métabolites des inhibiteurs, quand l'activité enzymatique est complètement inactivée, est environ de 1 : 1, en présence d'un agent piégeant (GSH) dans le mélange d'incubation ;
 - ☆ la structure des métabolites (caractérisés par analyse LC-MS/MS) confirme que la métabolisation de ces composés peut se faire par oxydation enzymatique du furane, qui peut conduire à la formation des intermédiaires réactifs, responsables de l'inactivation du CYP3A4. En présence de GSH, des résultats préliminaires montrent qu'un adduit du GSH sur le noyau furane est piégé pour chaque dérivé.

La plupart des molécules qui contiennent un cycle furane sont hépatotoxiques chez les animaux de laboratoire et chez l'homme. Le furane lui-même a une toxicité hépatique et est mutagène chez le rat (Sirica, 1996). La toxicité des furanes et leurs dérivées est une conséquence de l'activation métabolique catalysée par les cytochromes P450 (Peterson, 2000). La principale voie de biotransformation du furane comprend la scission de l'hétérocycle en dérivé dicarbonylique α,β -insaturé (Ravindranath, 1984 ; Parmar, 1993 ; Chen, 1995 ; Baer, 2005 ; Peterson, 2005). Ce métabolite est très réactif et il est capable d'attaquer l'ADN et les protéines et de former une liaison covalente, avec conséquente toxicité aigue ou cancérogénèse. L'ouverture oxydative du cycle du furane et la liaison irréversible aux protéines des dérivés γ -cétoenales résultantes, ont été démontrées par des études métaboliques sur plusieurs molécules qui contiennent un furane. Par exemple, des études sur le composé L-739,010 – un inhibiteur de la 5-lipoxygénase – et sur le composé L-754,394 – un médicament anti-HIV – ont démontrée la formation d'adduits covalents, en suite à l'incubation de ces molécules avec microsomes humains, en présence de NADPH (Zhang, 1996 ; Sahali-Sahly, 1996).

Des autres produits possibles de la métabolisation du cycle furane, reportés dans la littérature, sont les dérivés de l'acide γ -cétobutyrique. Les produits du métabolisme du methoxsalen (8-methoxy-psoralen) (Kolts, 1979), qui est un inhibiteur suicide des cytochromes P450 (CYP2A6 du foie humain – Koenigs, 1997), sont des dérivés de l'acide γ -cétobutyrique. Un autre exemple de molécule ayant un cycle furane et dont le métabolite principal est un γ -cétobutyrique instable, est le furfenorex (Inoue, 1986) ; le métabolisme de ce composé a été étudié *in vivo* chez le rat et *in vitro*, par incubation avec les microsomes de foie de rat.

Le mécanisme proposé pour la biotransformation du cycle furane dans un métabolite ouvert, est illustré en figure 5.1. Les métabolites résultants de cette biotransformation peuvent être soit des acides γ -cétocarboxyliques (voie A), soit des α,β -dicarbonyles insaturés (voie B).

Dans les deux cas, la réaction catalytique est initiée par formation du 2,3-époxyde du furane ; cet époxyde se réarrange directement en hydroxyfurane, qui existe principalement sous forme de la tautomère lactone. L'hydrolyse de la lactone produit l'acide γ -cétocarboxylique (figure 5.1 ; voie A) (Kolís, 1979). Alternativement, l'ouverture de l'époxyde du furane peut conduire à la formation d'un γ -cétoenal (figure 5.1 ; voie B) (Khojasteh-Bakht, 1999).

Les études de métabolisation et d'identification des produits des deux composés Roche analysés dans cette thèse, donnent des résultats similaires à ceux reportés dans la littérature et peuvent amener à des conclusions analogues. En fait, parmi les produits du métabolisme des deux composés ayant un cycle furane, on retrouve des produits dont le poids moléculaire $[M + H_2O_2]$ correspond soit à des 4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-furanes soit à des dérivées substituées de l'acide γ -cétobutyrique isomères (figures 4.14 et 4.20 – Section 4.3). En présence de GSH, on piège des adduits de masse $[M + O + GSH - 2 \cdot H_2O]$ analogues aux adduits décrits dans la littérature (figure 5.2) (Dalvie, 2002 ; Peterson, 2005).

La structure exacte et certaine de ces intermédiaires réactifs n'a pas été déterminée par analyse RMN, à cause de problèmes expérimentaux. Pourtant, l'analyse effectuée par LC-MS/MS offre des résultats qui permettent de formuler des hypothèses sur la structure des métabolites réactifs et sur le mécanisme de la réaction d'inhibition suicide.

Les composés Roche analysés dans cette thèse ont la capacité de provoquer l'inhibition suicide du CYP3A4 et on a des évidences expérimentales pour soutenir que un des produits principaux de leur métabolisation par le CYP3A4 même, est probablement un dérivé de l'acide γ -cétobutyrique. De même, en présence de glutathion des adduits pyrroliques dérivant du cycle furane sont formés.

Donc on pourrait déduire que les composés Roche sont biotransformés dans des intermédiaires réactifs en suivant une voie métabolique similaire à celle décrite en littérature pour les cycles furanes (Kolís, 1979 ; Khojasteh-Bakht, 1999 ; Dalvie, 2002 ; Peterson, 2005).

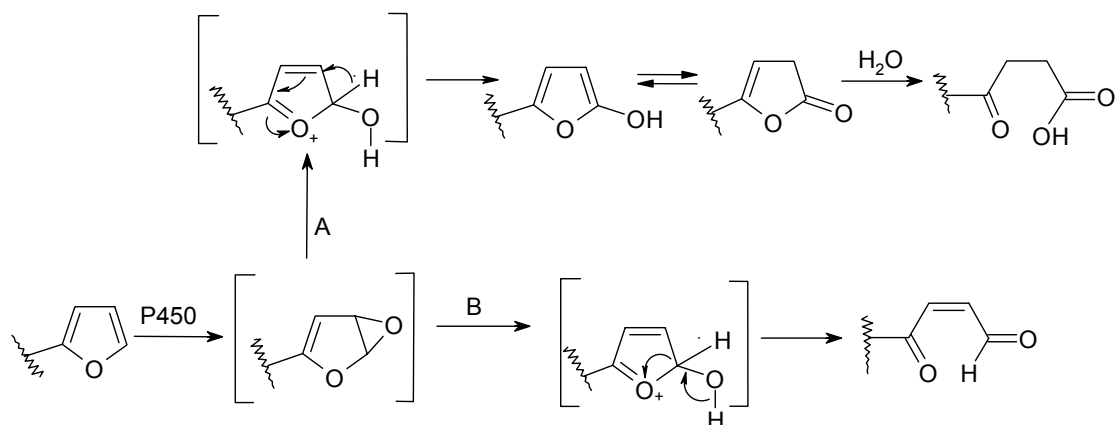


Figure 5.1 : Schéma générale des voies métaboliques du furane via formation d'un époxyde par action des cytochromes P450. La voie A conduit à la formation d'un acide γ -cétobutyrique ; la voie B a comme produit final une γ -cétoénale (Schéma adapté de Dalvie, 2002).

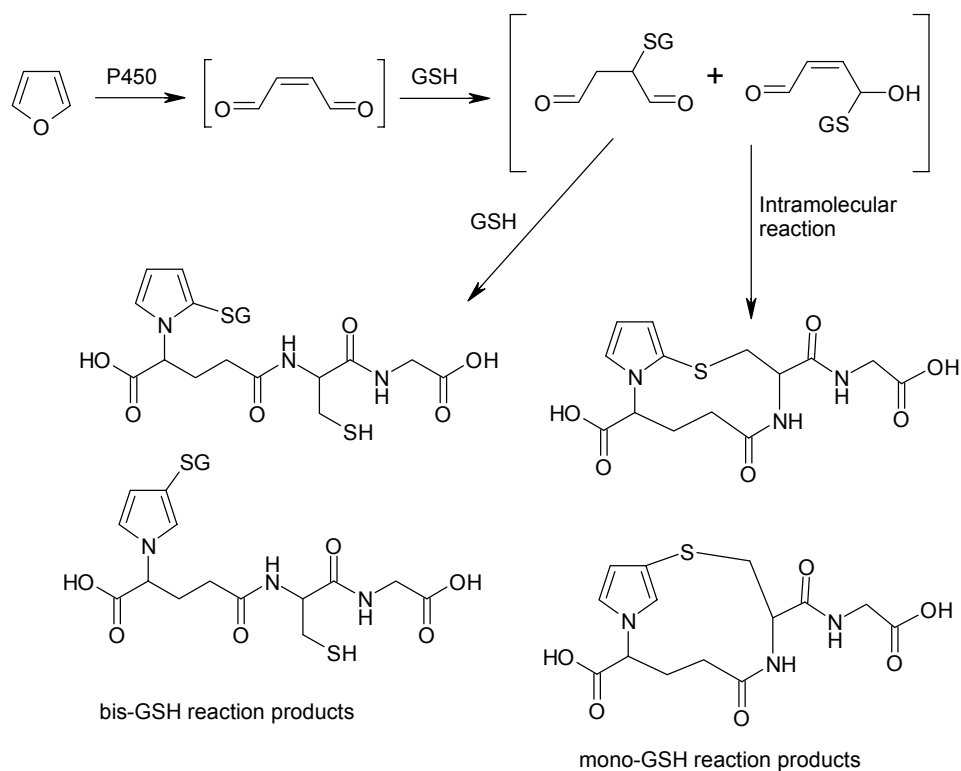


Figure 5.2 : Schéma du métabolisme du cycle furane en cis-2-butene-1,4-dial, ce produit réagit avec le GSH pour former des mono- et bis- adduits au glutathion (Peterson, 2005).

6. Conclusions

6. Conclusions

Le travail de cette thèse a été focalisé sur les inhibitions suicides des cytochromes P450 et en particulier sur l'importance de les éviter au cours de la conception de nouvelles molécules à action thérapeutique et sur la nécessité de les identifier le plus précocement possible dans le processus de développement.

En clinique, les conséquences de l'inhibition suicide peuvent être, d'un côté des interactions médicamenteuses graves, d'autre côté des réactions auto-immunitaires et une hépatotoxicité qui, dans certains cas, peut arriver à provoquer la mort du patient. A cause de la gravité des conséquences, il est important d'éviter de développer des médicaments donnant l'inhibition suicide des cytochromes P450.

La stratégie proposée dans cette thèse pour éviter l'inhibition suicide dans les nouveaux médicaments concerne l'ensemble des phases de l'évolution d'un nouveau composé thérapeutique :

- A) le design de la molécule ;
- B) l'analyse du composé dans les stades précoces de son développement pour déterminer l'inhibition dépendant du temps (TDI) ;
- C) l'analyse approfondie d'un composé qui montre activité comme inhibiteur dépendant du temps (TDI), pour établir s'il est effectivement un inhibiteur suicide.

A) Dans la phase de design des nouvelles molécules thérapeutiques, éviter les structures chimiques connues comme responsables d'inhibition suicide. C'est peut être la première étape du développement de molécules plus sûres pour les patients. Donc, la connaissance des structures chimiques des inhibiteurs suicides des cytochromes P450 peut constituer un élément déterminant.

Le premier objectif de cette thèse était de réaliser une revue générale de la littérature scientifique et de résumer les données descriptives de tous inhibiteurs suicides connus sous une forme schématique et facile à consulter (particulièrement pour les chimistes) : on a choisi de créer une base de données électronique en format ISIS/Base.

Les groupements chimiques rapportés dans la littérature, comme responsables d'inhibition suicide des cytochromes P450, ne se comporteront pas nécessairement dans la même façon quand ils sont introduits dans une nouvelle structure. En fait, l'efficacité d'inactivation et la

spécificité pour une isoforme dépendent de la structure globale de chaque molécule et non seulement de la présence d'un groupement particulièrement réactif. De plus, le design des nouveaux composés thérapeutiques doit aussi tenir en compte que dans la nouvelle molécule il faut inclure les structures spécifiques nécessaires à l'action du composé sur la cible thérapeutique. Donc, il n'est pas toujours possible de modifier librement la structure chimique d'un nouveau composé sans affecter son efficacité thérapeutique. Dans ce cas, il peut être utile de masquer la sous-structure dangereuse avec des substituants.

Grâce à cette base de données sur les inhibiteurs suicides, les chimistes peuvent maintenant avoir un support pratique dans le design des nouvelles molécules thérapeutiques.

- B) Une deuxième étape de la prévention de l'inhibition suicide des cytochromes P450 est la détection des inactivateurs le plus précocement possible dans le processus de leur développement. On a mis en place et validé une méthode à haut débit (« high throughput ») pour la détection des inhibiteurs dépendants du temps (TDI). Ce test est spécialement conseillé pour les composés contenant un groupement rapporté dans la base de données, une « alerte structurale », et qui pourraient provoquer l'inhibition suicide. La méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps présentée dans cette thèse permet d'estimer les valeurs des constantes cinétiques de la réaction d'inactivation (K_I et k_{inact}) et de mesurer l'efficacité de la molécule comme inhibiteur compétitif (IC_{50}) en utilisant des données obtenues par une seule expérience. La réalisation pratique du test est simple et rapide, et effectuée sur plaques à 96 puits. Il est donc possible d'analyser plusieurs composés (un maximum de sept plus le contrôle positif sur chaque plaque) en même temps. Cette caractéristique de la méthode rend possible la comparaison des valeurs des constantes cinétiques d'inactivation de plusieurs composés et permet de déduire des relations structure-activité (SAR) (structure-inactivation) pour des classes de composés de structure similaire. Donc la nouvelle méthode à haut débit pour la détermination de l'inhibition dépendant du temps (TDI) est un outil pour la prévention de l'inhibition suicide à plusieurs niveaux : i) la détection des inhibiteurs dépendant du temps ; ii) la quantification de l'efficacité d'inhibition ; iii) la comparaison entre différents composés et l'établissement de relations structure-inhibition dépendant du temps, dans le but d'améliorer les molécules.

C) La capacité de provoquer l'inhibition dépendante du temps des cytochromes P450 est une importante caractéristique des inhibiteurs suicides, mais elle ne suffit pas pour cataloguer un composé dans cette catégorie.

Dans cette thèse on a analysé la capacité de provoquer l'inhibition suicide de deux composés ayant un cycle furane dans leur structure. Le furane est un groupement souvent rapporté dans la littérature comme responsable de l'inhibition suicide des cytochromes P450 (une alerte structurale). En plus, les deux composés Roche se sont montrés capables de provoquer l'inhibition dépendante du temps sur le CYP3A4. Donc, on a réalisé des expériences supplémentaires pour démontrer qu'ils sont effectivement des inhibiteurs suicides et pour réunir des informations sur les intermédiaires réactifs de la réaction d'inactivation. Les données expérimentales ont montré que les deux composés ont les caractéristiques d'inhibiteurs suicides du CYP3A4 et qu'ils sont métabolisés par cette isoforme. Parmi les métabolites, il y a des composés instables (dérivés substitués de l'acide γ -cétobutyrique) indiqués comme impliqués dans l'inhibition suicide dans plusieurs publications. On peut donc supposer que le mécanisme de l'inhibition suicide provoquée par ces composés soit analogue à celui décrit dans la littérature (Kolis, 1979 ; Khojasteh-Bakht, 1999 ; Dalvie, 2002).

La base de données et le programme de calcul de la nouvelle méthode de détermination des inhibiteurs dépendants du temps sont des instruments actuellement utilisés chez F. Hoffmann-La Roche, dans les centres de recherche de Bâle (CH) et de Penzberg (D).

La mise à jour périodique de la base de données sera une tâche fondamentale pour se maintenir un outil actualisé et valable pour les pharmaco-chimistes qui dessinent les molécules thérapeutiques de l'avenir.

Le programme d'élaboration des données de fluorimétrie pour le calcul des constantes de l'inhibition dépendante du temps du CYP3A4 pourra être utilisé comme base pour construire des programmes analogues pour des autres isoformes des cytochromes P450, en particulier des CYP2C9 et CYP2D6. Mais auparavant, le programme devra être validé pour ces deux isoformes. Grâce à cette nouvelle méthode, il sera aussi possible d'analyser des autres groupes des composés, de déduire des relations structure-activité et fournir des indications aux chimistes pour améliorer les composés en phase de développement.

En conclusion, dans ce travail de thèse on a proposé une stratégie possible pour éviter le design et le développement des nouvelles molécules thérapeutiques qui provoquent l'inhibition suicide des cytochromes P450, avec toutes ses graves conséquences pour les patients. Les stades dont se compose cette stratégie sont :

- * la compilation d'une base de données sur les inhibiteurs suicides pour indiquer des alertes structurales, des sous-structures potentiellement dangereuses ;
- * la mise au point et validation d'une nouvelle méthode pour la détermination des inhibiteurs dépendants du temps et pour la mesure de leur efficacité d'inhibition ;
- * un exemple d'utilisation de cette nouvelle méthode pour la définition des relations structure-activité (structure-inhibition suicide) d'une classe de composés qui contiennent dans leur structure chimique un cycle furane diversement substitué ;
- * un exemple d'utilisation des deux outils développés pour i) indiquer un groupement chimique potentiellement dangereux présent dans la structure de deux composés Roche, et ii) pour déterminer leur activité comme inhibiteurs dépendants du temps. Ces deux caractéristiques ont été la condition pour accomplir des expériences ultérieures, afin de démontrer que les deux composés sont, en fait, des inhibiteurs suicides, qui se fixent de façon covalente sur le CYP3A4.

7. Partie expérimentale

7. Partie expérimentale

7.1. Matériels et instruments

7.1.a Réactifs chimiques et enzymes

Tous les composés chimiques analysés ont été produits dans les laboratoires de chimie chez Hoffmann-La Roche, Bâle, (PRBD-CM), ainsi que les deux analogues radioactifs (PRBN-TCK). Les cytochromes P450 utilisés avaient deux provenances : cytochromes P450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4) exprimés dans les microsomes des cellules d'insectes infectés avec le Baculovirus appelées Supersomes[®], achetés chez BD-Gentest ; cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2D6 et CYP3A4) exprimés dans des membranes de E. Coli produits chez Hoffmann-La Roche et fournis par le Dr. S. Hanlon (PRBN-TB). Tous les cytochromes ont été conservés à -80 °C.

Les microsomes de foie humain (pooled human liver microsomes - HLM) ont été achetés chez BD-Gentest, et conservés à -80 °C.

Les substrats spécifiques utilisés pour chaque isoforme sont les suivantes : pour le CYP1A2 et le CYP2C19, la 3-cyano-7-ethoxycoumarine (CEC) achetée chez Molecular Probes ; pour le CYP3A4, la 7-benzyloxy-4-(trifluorométhyl)-coumarine (BFC) et, pour le CYP2D6, la 3-(2-(N,N-diéthyl)-N-méthylamino(éthyl)-7-méthoxy-4)-méthylcoumarine (AMMC) achetées chez BD-Gentest ; pour le CYP2C9, la 4-trifluorométhyl 7-méthoxycoumarine (MFC) acheté chez Sigma Chemicals.

Les inhibiteurs utilisés comme contrôles positifs pour chaque isoforme sont les suivants : kétoconazole (CYP3A4) et furafylline (CYP1A2) provenant de Ultrafine Chemicals ; sulfaphénazole (CYP2C9), tranilcypromine (CYP2C19) et quinidine (CYP2D6) provenant de Sigma Chemicals.

Le NADP vient de Sigma Chemicals, le L-glutathione réduit (GSH) a été acheté chez Fluka Chemie.

Les composés utilisés pour la validation de la méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps sont les suivants : 17- α -éthynylestradiol, érythromycine, vérapamil, troléandomycine, mifépristone, achetés chez Sigma ; diltiazem, saquinavir et gestodène, fournis par Roche.

La glucose 6-phosphate déshydrogénase (G₆PDH) été fournie par Roche Diagnostics.

Les liquides de scintillation utilisés pour les expériences avec les composés radioactifs sont Ultima Gold liquid scintillation counting cocktail de Packard Bioscience B.V. (Groningen, The Netherlands), et Microscint 40 liquid scintillation cocktail de Perkin Elmer (Boston, MA).

7.1.b Appareils

Le robot utilisé pour effectuer les dilutions sur les Costar Plates à 96 puits (pour le test de détermination de l'IC₅₀) est un Beckman- Biomek 2000.

Le fluorimètre utilisé pour toutes les mesures de fluorescence sur les Costar Plates à 96 puits, est un BMG- Polarstar Galaxy.

Le compteur β à scintillation utilisé pour les composés marqués avec le ^{14}C , est un Beckman liquid scintillation counting system, LS6000TA; le compteur de radioactivité pour plaques à 96 puits, est un TopCount NXT 96-well plates counter (Packard – Boston, MA).

L'identification des métabolites a été effectuée chez le laboratoire de Metabolic Identification (PRBD-CS), chez Hoffmann-La Roche, Bâle. Les appareils utilisés sont : spectromètre de masse (MS/MS) Micromass Quattro Ultima – MS.

L'étude d'analyse des produits de piégeage effectuée à l'UMR 8601 (Paris) a été faite à l'aide d'une HPLC Surveyo (ThermoFinnigan, Orsay) et d'un détecteur à trappe d'ions LCQ Advantage (ThermoFinnigan, Orsay).

7.2. Test pour la détermination de l'IC₅₀

Le test utilisé dans cette thèse pour la détermination de l'IC₅₀ des inhibiteurs sur les différents isoformes des cytochromes P450 utilise les principes décrits par Crespi (Crespi, 1997) avec quelques modifications.

Le test est basé sur la mesure de la fluorescence émise par les produits fluorescents de la réaction entre des substrats spécifiques et les différents isoformes de cytochromes P450. Le test a été précédemment validé et employé sur cinq isoformes enzymatiques : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4. Il est réalisé sur une plaque à 96 puits sur laquelle ont lieu les incubations des substrats spécifiques pour chaque isoforme de cytochrome P450 et la lecture de la fluorescence en mode cinétique.

7.2.a Préparation des réactifs.

Les composés à tester sont conservés en solutions dans le DMSO à -20 °C, à la concentration de 10 mM, et décongelés juste avant l'utilisation. Les solutions d'inhibiteurs utilisés comme

contrôles positifs ont des concentrations différentes, pour permettre leur utilisation aux concentrations optimales dans le mélange d'incubation sans addition d'une quantité excessive ou trop faible de DMSO. Les concentrations des solutions des contrôles positifs sont les suivantes : kétoconazole 0,5 mM, sulfaphénazole 2 mM, furafylline 20 mM, quinidine 5 mM, tranylcypromine 100 mM.

Le système régénérateur (NADPH-regenerating system) est préparé à partir de 2,0 g de glucose 6-phosphate, sel disodique hydraté (G6P), 2,0 g de NADP et 1,33 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 100 mL d'eau. Les concentrations finales des réactifs dans le mélange d'incubation sont les suivantes : NADP 1,3 mM, G6P 2,9 mM, G₆PDH (rajoutée juste avant l'utilisation, 20 μL) 0,0067 mg/puits ou 0,9 U/puits. La solution mère de système régénérateur est divisée en fractions aliquotes (de 1,5 mL, quantité nécessaire pour une plaque) et conservée congelée à -20°C jusqu'à la dilution (jusqu'à un volume total de 15 mL) avec un tampon phosphate (pH 7.4) de concentration adapte pour chaque isoforme (table 7.1), juste avant l'utilisation.

7.2.b Préparation de la microplaque.

Cette phase de la préparation est réalisée par un robot Beckmann (figure 7.1).

Sur une plaque à 96 puits il est possible de mesurer l' IC_{50} de 7 composés inconnus plus le contrôle positif. La première étape de la préparation de la plaque est le transfert des solutions dans le DMSO (1,5 μL) des composés dans la première colonne de la plaque. Dans les mêmes puits sont pipetés 150 μL de système régénérateur dilué et mélangés avec les composés. Dans les 10 colonnes suivantes de la plaque sont pipetés 100 μL de système régénérateur de NADPH dilué et contenant 1% v/v de DMSO. Le robot réalise 8 dilutions 1:3 de la solution présente dans la première colonne de façon que les concentrations finales des composés dans le mélange d'incubation soient comprises entre 50 μM et 0,0076 μM . La dixième colonne est préparée dans la même façon mais sans inhibiteur (contrôle) et la onzième colonne sans inhibiteur sera laissée aussi sans substrat (blanc).

Après pré-incubation de la plaque contenant seulement les composés à tester et le système régénérant à 37 °C pendant 10 minutes, une solution (100 μL) contenant l'enzyme et son substrat est additionné à la plaque. Le pipetage a lieu directement dans le fluorimètre qui a deux pompes à piston pour pipeter les solutions de cytochrome et substrat, ou cytochrome seulement (blanc), sur la plaque. Les concentrations d'enzyme et des substrats spécifiques sont différentes pour chaque isoforme de cytochrome P450 : CYP3A4 0.6 pmol/puits, BFC 50 μM ; CYP1A2 0.5 pmol/puits, CEC 5 μM ; CYP2D6 1,5 pmol/puits, AMMC 1,5 μM ; CYP2C9 1,0 pmol/puits,

MFC 75 μM ; CYP2C19 1,0 pmol/puits, CEC 25 μM . Ces concentrations concernent le mélange d'incubation.

Dès que l'appareil finit d'ajouter les réactifs sur la plaque, commence la mesure de la fluorescence du produit de la métabolisation du substrat spécifique par le cytochrome P450. Les couples de longueurs d'onde choisies pour l'excitation et l'émission de la fluorescence sont spécifiques pour chaque substrat : BFC λ_{ex} 420 nm, λ_{em} 520 nm ; CEC λ_{ex} 390 nm, λ_{em} 460 nm ; AMMC λ_{ex} 390, λ_{em} 460 ; MFC λ_{ex} 390 nm, λ_{em} 520 nm.

L'ensemble des conditions des concentrations, les longueurs d'onde pour les substrats spécifiques et les contrôles positifs utilisés sont résumés en table 7.1.

CYP + Regenerating system + Substrate											CYP + Regenerating system	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Positive control	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Test 1	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
Test 2	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
Test 3	D	E	F	G	H	I	J	K	L			
Test 4	E	F	G	H	I	J	K	L				
Test 5	F	G	H	I	J	K	L					
Test 6	G	H	I	J	K	L						
Test 7	H	I	J									

Figure 7.1 : Schéma général de la distribution des réactifs sur la plaque à 96 puits, pour la mesure de l' IC_{50} par fluorescence.

7.2.c Calculs sur les données

La mesure de la fluorescence des produits de réaction entre les différents isoformes de cytochromes P450 et leurs substrats spécifiques est effectuée en mode cinétique, pendant des durées variables, de 16 minutes (pour le CYP3A4) jusqu'à 30 minutes (pour le CYP2D6 et CYP2C9).

Pour chaque concentration d'inhibiteur, on calcule la pente de la tangente à la courbe de fluorescence en fonction du temps (fluorescence vs. temps). Les pentes calculées sont successivement représentées dans un graphique en fonction de la concentration d'inhibiteur

(slope vs. log (concentration)) en échelle logarithmique, et la concentration d'inhibiteur correspondant au 50% de la pente maximale (calculée sur le contrôle sans inhibiteur) représente l'IC₅₀ (μM) du composé analysé (figure 7.2).

CYP isoforme	Specific substrate	Buffer conc (M)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Positive contrôle
CYP1A2	CEC (5 μM)	0.150	390	460	Furafylline (100 μM)
CYP2C9	MFC (75 μM)	0.050	420	520	Sulfaphenazole (10 μM)
CYP2C19	CEC (25 μM)	0.050	420	460	Tranylcypromine (500 μM)
CYP2D6	AMMC (1.5 μM)	0.175	390	460	Quinidine (0.5 μM)
CYP3A4	BFC (50 μM)	0.375	420	520	Kétoconazole (2.5 μM)

Table 7.1 : Résumé des conditions employées lors des tests : concentrations des substrats spécifiques, des tampons, des contrôles positifs et les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la fluorescence. Les concentrations indiquées sous chacun des inhibiteurs des contrôles positifs, correspondent aux concentrations maximales utilisées dans le test.

7.3 Méthode de détermination de l'inhibition dépendante du temps (TDI ou Time-Dependent Inhibition)

La méthode utilisée pour la détection de l'inhibition dépendante du temps (TDI) des composés analysés dans cette thèse (sauf si différemment mentionné) est une méthode basée sur la mesure de la fluorescence émise par les produits fluorescents formés par incubation des substrats spécifiques avec les cytochromes P450. L'activité catalytique des cytochromes P450 est mesurée après une pré-incubation avec la molécule soupçonnée de TDI en présence de système régénérateur de NADPH. Après des temps de pré-incubation variables, l'activité du cytochrome est mesurée par addition du substrat-test.

7.3.a Préparation de la plaque

Le système régénérateur de NADPH est préparé comme pour la mesure de l'IC₅₀ et dans le mélange de pré-incubation la concentration de NADPH est la même que pour les déterminations d'IC₅₀.

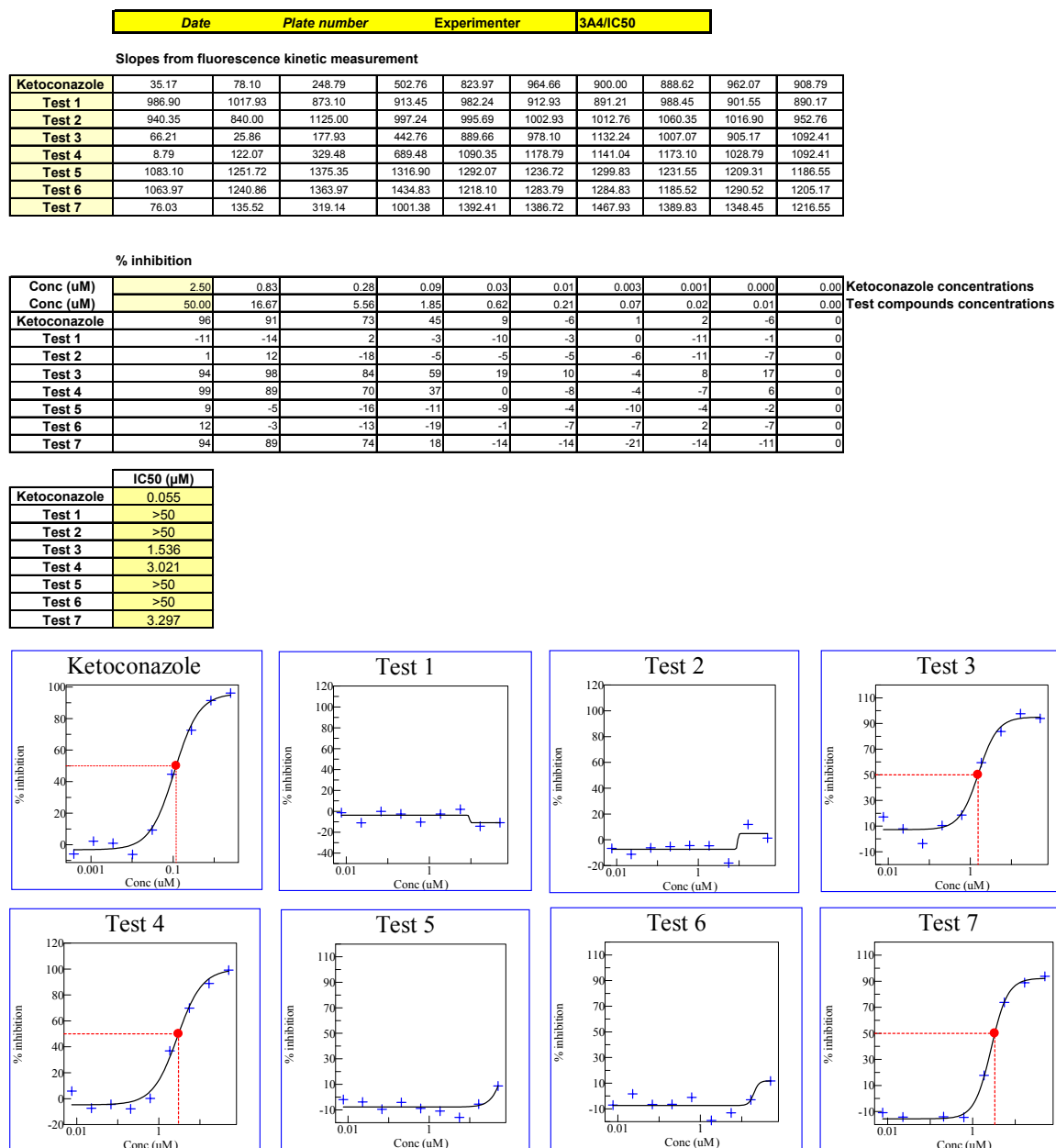


Figure 7.2 : Exemple d'une page de calculs d'IC₅₀. Dans cette page tous les calculs des composées d'une plaque sont effectués au même temps, à partir des pentes des courbes d'intensité de la fluorescence en fonction du temps, calculées directement par le Fluostar. Dans le cas où l'inhibition n'atteint pas 50% de l'activité du cytochrome P450, l'IC₅₀ est indiquée comme >50 µM, la plus haute concentration utilisée.

Sur une plaque à 96 puits il est possible de tester la TDI de 4 composés inconnus (chacun en 2 concentrations) plus le contrôle positif et le contrôle négatif. L'inhibition est mesurée après quatre temps de pré-incubation (figure 7.3). Les deux concentrations à lesquelles les deux composés sont testés sont choisies en fonction de l'IC₅₀ des composés : l'une a une valeur proche de l'IC₅₀, l'autre est 5 ou 10 fois la valeur d'IC₅₀. Les conditions utilisées pour chaque isoforme de cytochromes P450 sont résumées en table 7.2.

Dans une série de 12 petits flacons, sont préparées les mélanges pour la pré-incubation : le système régénérateur dilué (500 µL) est mélangé avec du DMSO (2,5 µL) (blanc et contrôle) ou avec une solution à concentration adéquate des composés à tester et du contrôle positif (2,5 µL, de façon que la concentration de DMSO soit au maximum 0,5% v/v), dans chaque flacon. Ce mélange est transféré sur la plaque à 96 puits (50 µL /puits), dans chaque colonne est transféré la solution d'un seul composé à une seule concentration (figure 7.3). Les contrôles positifs sont : troléandomycine (1 et 10 µM) pour le CYP3A4, furafylline (1 et 10 µM) pour le CYP1A2, sulphaphénazole (1 et 5 µM) pour le CYP2C9; pour le CYP2D6 et le CYP2C19 on a pas utilisés des contrôles positifs.

Le cytochrome P450 est dilué par du tampon phosphate (pH 7,4) à la concentration indiquée (table 7.1), pour obtenir dans le mélange de pré-incubation une concentration d'enzyme égale à celle utilisée lors de la détermination de l'IC₅₀.

7.3.b Pré-incubation

La pré-incubation est effectuée dans un incubateur pour plaques, à 37 °C et sous agitation de 400 rpm. Elle est initiée par addition du cytochrome P450 dilué (50 µL) sur la plaque déjà préparée avec le mélange de système régénérateur de NADPH et les composés à tester. La solution de cytochrome est pipetée seulement dans deux lignes de la plaque (pour avoir les données en double), qui correspondent à la plus longue durée de pré-incubation. Les deux lignes suivantes, qui correspondent à la deuxième durée de pré-incubation, sont remplies et ainsi de suite. En général, pour des composés nouveaux, les temps de pré-incubation utilisés sont les suivantes : 0, 10, 15, 20 minutes. Ensuite, les durées de pré-incubation peuvent être adaptées en fonction de l'efficacité TDI des composés à tester. Les deux composés analysés dans ce travail de thèse ont aussi été pré-incubés pendant des temps plus longs : 0, 10, 20, 40 minutes.

	CYP3A4 (μM)		CYP2D6 (μM)		CYP1A2 (μM)		CYP2C9 (μM)		CYP2C19 (μM)	
Contrôle	1	10			1	10	1.25	5		
RO0683569	125	62.5	125	62.5	125	10	62.5	5	125	62.5
RO0674274	25	2.5	125	62.5	125	62.5	125	62.5	10	1

Table 7.2 : Concentrations des composés utilisés pour le test de TDI avec les différents isoformes des cytochromes P450. Les mêmes concentrations ont été aussi utilisées pour le test de la TDI en présence de GSH ou de kétoconazole, sur le CYP3A4. Sur le CYP3A4 le test a été répété avec plusieurs concentrations des composés pour avoir données suffisantes à calculer les paramètres K_i et k_{inact} .

7.3.c Mesure de l'activité enzymatique résiduelle

La mesure de l'activité du cytochrome P450 avec son substrat spécifique est démarrée juste après l'addition du cytochrome P450 dans les deux dernières lignes de la plaque (temps zéro). La réaction commence par addition d'un mélange de système régénérateur de NADPH et du substrat spécifique (100 μL /puits) dans la plaque pré-incubée. Dans la première colonne de la plaque, on additionne le système régénérateur de NADPH seul (blanc).

L'activité enzymatique est mesurée par fluorescence du produit de la réaction catalysée par le cytochrome P450 sur son substrat spécifique.

7.3.d Calculs sur les données

Toutes les valeurs de fluorescence sont utilisées après soustraction de la valeur du blanc correspondante.

L'activité résiduelle aux différents temps de pré-incubation est calculée comme pourcentage de l'activité initiale (temps zéro de pré-incubation) de l'échantillon sans inhibiteur (contrôle).

Par comparaison des pourcentages d'activité résiduelle après différentes durées de pré-incubation, on a la première indication sur la capacité des molécules testées de provoquer une inhibition suicide (TDI).

Le calcul des paramètres descriptifs de la réaction de « time-dependent inhibition » (K_i et k_{inact}) n'est pas possible si le test est effectué seulement avec deux concentrations d'inhibiteur. On peut alors effectuer le même test en occupant les colonnes de la plaque avec plusieurs concentrations de la même substance au lieu de seulement deux concentrations de plusieurs composés. Dans ce

cas, on aura à disposition toutes les données pour calculer K_I et k_{inact} . Pour calculer ces paramètres, les pourcentages d'activité résiduelle sont transformés en logarithmes, portés sur un graphique en fonction du temps de pré-incubation et on détermine la constante d'inactivation k_{obs} (la pente de la droite de régression) pour chaque concentration d'inhibiteur. Ces constantes sont en suite portées sur un nouveau graphique en fonction de la concentration inhibiteur. Les données sont analysées en utilisant une équation dérivée de l'équation de Michaelis-Menten (section 3.2.b), pour des réactions de pseudo-premier ordre. La procédure de calcul est la même utilisée dans la nouvelle méthode de TDI, mais il y a des différences dans les méthodes pour obtenir les données nécessaires au calcul.

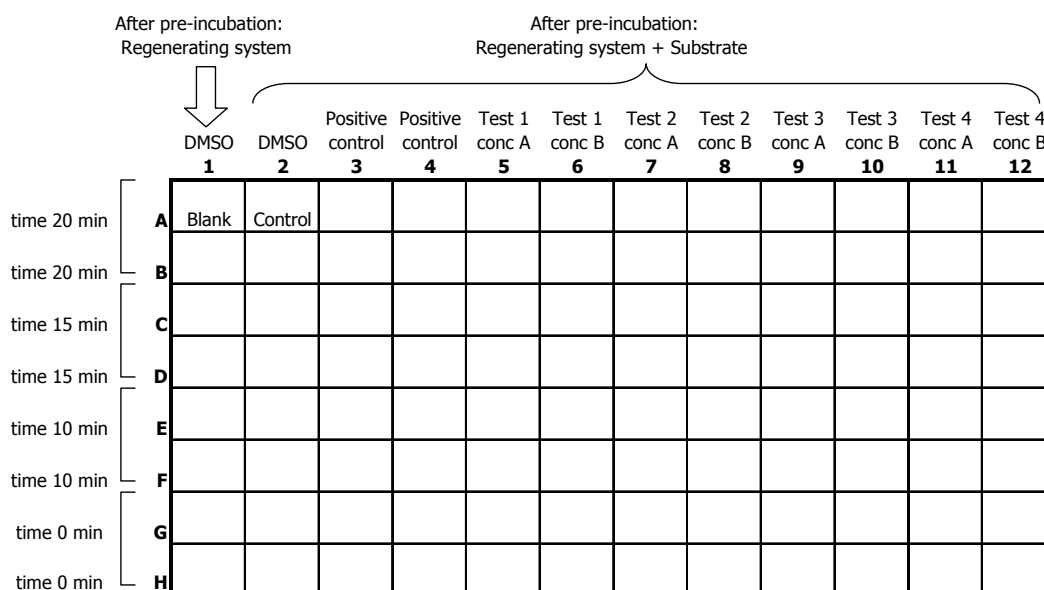


Figure 7.3 : Schéma général des temps de pré-incubation et de la distribution des réactifs sur la plate à 96 puits, pour la mesure de la TDI par la mesure de fluorescence des produits de métabolisation des cytochromes P450 sur leurs substrats spécifiques.

7.4 Méthode pour la détermination de l'inhibition dépendante du temps (TDI) en présence de GSH

La même méthode décrite pour la détermination de la TDI (section 7.3) est aussi utilisée pour la détermination de la TDI en présence de GSH (10 mM).

Les durées de pré-incubation (à 37 °C et sous agitation) utilisées sont les suivantes : 0, 10, 20, 40 minutes. L'incubation en présence de GSH n'a été réalisée que sur le CYP3A4, qui avait déjà

montré une inactivation en fonction du temps (TDI) par les deux composés analysés précédemment sur les cinq isoformes de P450.

Le GSH à la concentration de 10 mM est additionné dans le mélange de système régénérateur de NADPH plus composés ou DMSO, transféré dans la plaque avant la pré-incubation (50 μ L/puits).

Chacun des deux composés est testé seulement à deux concentrations, donc les paramètres K_I et k_{inact} ne sont pas calculés. Mais la comparaison de l'activité résiduelle du même composé à la même concentration pendant le temps de pré-incubation avec et sans GSH, indique que la présence de ce nucléophile dans le mélange d'incubation ne protège pas de la TDI.

On a testé les deux composés aux mêmes concentrations utilisées pour le test précédent de détermination de la TDI.

7.5 Test pour la détermination de la TDI en présence de kétoconazole

La même méthode décrite pour la détermination de la TDI (section 7.3) est aussi utilisée pour la détermination de la TDI en présence de kétoconazole. Le kétoconazole est un composé connu comme substrat et inhibiteur réversible du CYP3A4 (Rendic, 2002).

Les temps de pré-incubation (à 37 °C et sous agitation) utilisés sont les suivantes : 0, 10, 20, 40 minutes.

L' IC_{50} du kétoconazole précédemment déterminée est de 0,055 μ M. Le kétoconazole est utilisé pour ce test en trois concentrations correspondants à : son IC_{50} (0,06 μ M), son IC_{20} (0,01 μ M) et son IC_{80} (0,35 μ M).

Sur une plaque à 96 puits, il est possible de tester seulement un composé, avec le blanc et le contrôle (figure 7.4), en deux concentrations pour chaque concentration de kétoconazole.

À la fin de la pré-incubation, une solution de système régénérateur de NADPH (blanc) ou de système régénérateur et BFC (substrat spécifique du CYP3A4), sont additionnées (100 μ L) sur la plaque et on mesure la fluorescence produite, en mode cinétique.

Chacun des deux composés est testé seulement à deux concentrations, donc les paramètres K_I et k_{inact} n'ont pas été calculés. Mais la comparaison de l'activité résiduelle du même composé à la même concentration et au même temps de pré-incubation, sans kétoconazole, et en présence de kétoconazole à différentes concentrations, peut indiquer clairement les effets sur l'inhibition qui donne l'addition de cette substance dans le milieu d'incubation.

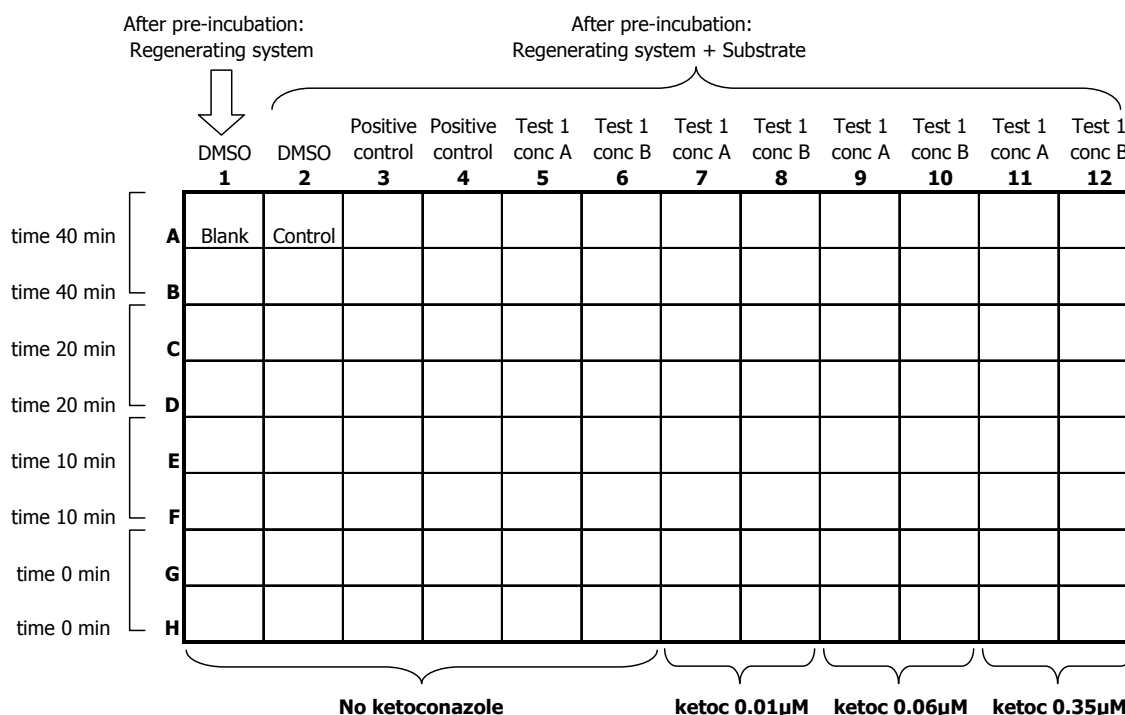


Figure 7.4: Schéma général des durées de pré-incubation et de distribution des réactifs sur la plaque à 96 puits, pour la mesure de la TDI par mesure de fluorescence des produits de la réaction catalysée par chaque isoforme de cytochromes P450 et son substrat spécifique. Dans la partie basse de la figure sont indiquées les concentrations de ketoconazole utilisées.

7.6 Incubation pour la détermination de la liaison covalente aux cytochromes P450


Les incubations pour la détermination de la liaison covalente aux protéines sont effectuées sur une plaque deep well (2 mL / puits) à 96 puits. Les composés radioactifs (marqués avec le ^{14}C) sont incubés avec le CYP3A4, dans un volume total de 250 µL pour un temps maximale de 30 minutes. Les temps d'incubation sont : 0, 5, 15, 30 minutes, et l'incubation est démarrée par addition du CYP3A4 dilué ou des microsomes de foie humain (HLM) déjà mélangés au composé sur la plaque contenant le système régénérateur de NADPH (figure 7.5(a)). La concentration du CYP3A4 recombinant est de 67 pmol P450 / mL (0,5 mg protéines / mL), et la concentration des microsomes humains est de 0,5 mg protéines / mL, la concentration à laquelle les composés sont incubés est 10 µM. L'incubation est aussi réalisée en absence de système régénérateur de NADPH (composés RO à concentration de 10 µM), pour vérifier l'absence d'une liaison non

spécifique des composés analysés sur le cytochrome P450 et sur le plastique de la plaque employée.

Après chaque temps d'incubation, des fractions aliquotes (50 μ L) de contrôle (sans système régénérateur de NADPH) et de CYP3A4 inactivé sont prélevées dans la plaque et mélangées avec trois volumes de méthanol glacé, pour arrêter la réaction enzymatique et permettre la précipitation des protéines. Cette précipitation est effectuée sur une plaque « PCR plate » à 96 puits (300 μ L / puits) en polypropylène, qui est ensuite fermée avec une feuille laminée d'aluminium (Heat sealing film - Eppendorf) collée par la chaleur sur la plaque, en utilisant un scelleur de plaques (Heat plate sealer – Eppendorf).



La plaque fermée est centrifugée pour 40 minutes (4000 rpm) à 4 °C pour obtenir des culots compacts de protéines précipitées, puis le surnageant est enlevé. Les protéines sont alors rincées avec différents solvants afin que tout le composé lié aux protéines de façon non covalente soit éliminé. Le premier rinçage est réalisé avec du MeOH, suivi d'une sonication (15 minutes) et d'une centrifugation (les temps et conditions de centrifugation utilisées sont toujours les mêmes). Les deuxième et troisième rinçages sont effectués avec de l'acétate d'éthyle, suivi d'une sonication (15 minutes) et d'une centrifugation. Après ce traitement les culots de protéines sont re-suspendues en 120 μ L de tampon phosphate à pH 7,4 et concentration 0,5 M et laissées sous agitation pendant 20 minutes. Des fractions aliquotes de cette suspension (30 μ L) sont transférées dans des tubes qui contiennent du liquide de scintillation (5 mL) et la radioactivité liée à la fraction protéique est mesurée avec le compteur β (Beckman). Toutes les mesures de radioactivité sont effectuées en triplicat.

La même expérience est répétée en présence de concentrations différentes de glutathion (GSH) dans le milieu d'incubation. Le GSH est dissout directement dans le système régénérateur de NADPH ou dans le tampon (blanc) ; les concentrations finales de GSH dans le mélange d'incubation sont respectivement : 50, 20, 10, 5, 0 mM (figure 7.5(b)). Avec cette expérience on peut estimer l'influence du GSH sur le taux de liaison covalente des métabolites réactifs sur les protéines microsomales.

		Buffer 150 μ L	240 μ L + 3 μ L 14 C-RO (2 mM)	Regenerating System 150 μ L						
		A	B	C	D	E	F	G	H	
RO0674274	1		CYP3A4 + RO							
	2		HLM + RO							
RO0683569	3		CYP3A4 + RO							
	4		HLM + RO							
										
		100 μ L		100 μ L						

(a)

(a)

		Buffer 150 μ L	240 μ L + 3 μ L 14 C-RO (2 mM)	Regenerating System 150 μ L						
		A	B	C	D	E	F	G	H	
GSH = 0	1		CYP3A4 + RO							
	2		HLM + RO							
GSH = 5 mM	3		CYP3A4 + RO							
	4		HLM + RO							
GSH = 10 mM	5		CYP3A4 + RO			RO compound 1				
	6		HLM + RO							
GSH = 20 mM	7		CYP3A4 + RO							
	8		HLM + RO							
GSH = 50 mM	9		CYP3A4 + RO							
	10		HLM + RO							
										
		11								
		12	100 μ L	100 μ L						

(b)

(b)

Figure 7.5: Schéma général de la préparation des plaques pour la détermination de la liaison covalente aux protéines des métabolites réactifs des composés sous analyse. (a) Incubation de deux composés au même temps en absence de GSH. (b) Incubation des deux composés à la fois, en présence de différentes concentrations de GSH dans le mélange d'incubation.

7.7 Incubation pour la détermination de la stœchiométrie de liaison

Les incubations pour la détermination de la liaison covalente aux protéines sont effectuées sur une plaque deep well (2 mL / puits) à 96 puits. Les composés radioactifs (marqués avec le ^{14}C) sont incubés avec le CYP3A4, dans un volume total de 500 μL pour un temps maximale de 60 minutes. Les temps d'incubation sont : 0, 15, 30, 60 minutes, et l'incubation est démarrée par addition d'un mélange de CYP3A4 dilué et composé sur la plaque déjà préparée avec le système régénérateur ou le tampon. La concentration du CYP3A4 est de 67 pmol P450 / mL (0.5 mg protéines / mL), et les concentrations à lesquelles les composés sont incubés sont les suivantes : 25, 12,5, 5, 2,5, 1, 0 μM (figure 7.6(a)). L'incubation est aussi effectuée sans addition de système régénérateur de NADPH (composés RO à concentration de 5 μM) et sans addition soit de CYP3A4 que de système régénérateur, pour vérifier l'absence d'une liaison non spécifique des composés analysés sur le cytochrome P450 et sur le plastique des plaques, les filtres et les différents systèmes employés (figure 7.6(b)).

À la fin de l'incubation, des fractions aliquotes (50 μL) de contrôle (sans système régénérateur de NADPH) et de CYP3A4 inactivé (avec système régénérateur de NADPH) sont prélevées dans chaque puits de la plaque (incubés pendant des temps différents) et mélangées avec trois volumes de méthanol glacé, pour permettre la précipitation des protéines.

Une autre fraction (100 μL) du mélange d'incubation, est transférée dans une plaque Costar déjà préparée avec un mélange de système régénérateur de NADPH dilué et BFC (substrat spécifique du CYP3A4). Immédiatement après on mesure la fluorescence en mode cinétique pour la détermination de l'activité résiduelle du CYP3A4.

Les 350 μL de mélange d'incubation restant dans la plaque, sont transférés dans une plaque spéciale pour comptage de radioactivité. À l'aide d'un transfèreuse de plaque (Packard Harvester), le contenu des 96 puits est aspiré en même temps dans une plaque comportant au fond de chaque puits un filtre en fibre de verre où les protéines sont retenues (UniFilter GF/C plate). Les protéines restent donc bloquées dans les filtres avec les composés radioactifs fixés par liaison covalente, mais la radioactivité en excès et liée aux protéines par interactions faibles non covalentes, est éliminée par les 4-5 rinçages avec tampon Tris à pH 4.0. Le fond de la plaque est ensuite obturé à l'aide d'un film autocollant et on rajoute le liquide de scintillation dans chaque puits (50 μL) et la radioactivité est comptée directement sur cette plaque, par un appareil Packard TopCount NXT.

La même expérience est accomplie aussi en présence de GSH (5 mM) dans le milieu d'incubation. Les échantillons sont traités dans la même façon et la radioactivité est mesurée suivant la même procédure.

7.7.a Calculs sur les données

Le calcul de la quantité de composé radioactif lié aux cytochromes P450 quand l'inactivation est complète, est effectué par une méthode graphique.

Les valeurs de radioactivité mesurées dans la fraction protéique sont transformées en quantité de produit lié (en nano moles de produit radioactif lié). Sur un diagramme on représente l'activité enzymatique résiduelle (% residual activity) en fonction de la quantité de produit liée par nano mole de cytochrome P450 (nmol bound ^{14}C / nmol CYP3A4). Le point où la droite d'extrapolation des données coupe l'axe des x, correspond au nombre des molécules de composé liées au CYP3A4 nécessaire pour l'inactivation totale de l'activité enzymatique.

7.8 Incubations pour la détermination du rapport de partition

Le rapport de partition (partition ratio) est défini comme le rapport entre le nombre de molécules métabolisées pour chaque molécule d'enzyme inactivée et elle représente l'efficacité de l'inactivateur suicide (mechanism-based inhibitor) (Silverman, 1995). L'incubation pour obtenir les données nécessaires à calculer le rapport de partition est effectuée suivant la même procédure décrite pour la détermination de la stœchiométrie de liaison covalente.

L'expérience est réalisée en triplicat, sans la plaque de contrôle, car la liaison non spécifique entre les composées et le plastique ou les protéines a été déjà exclue.

Pourtant, les données sont traitées différemment.

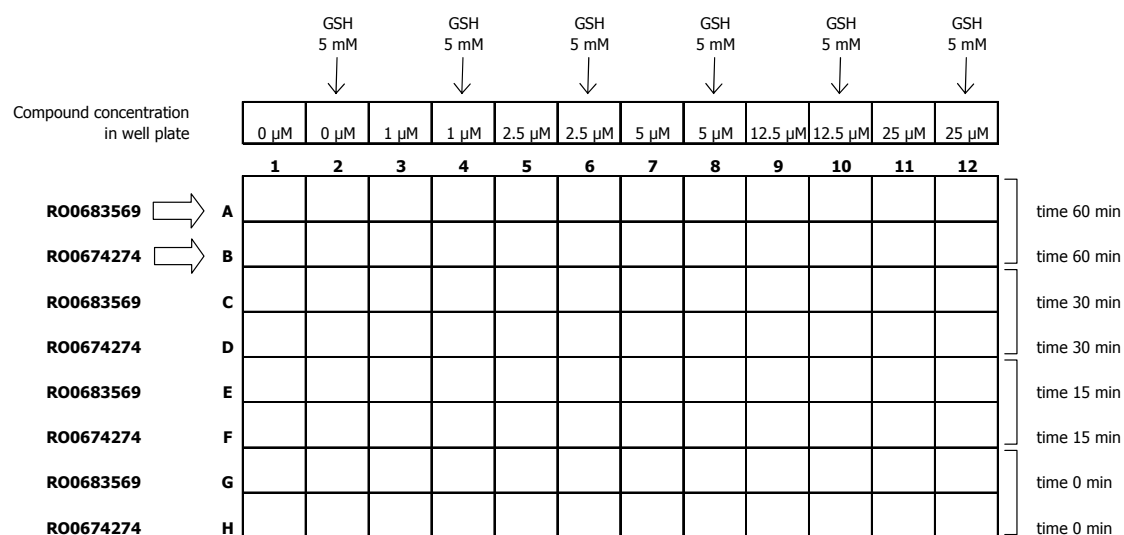
7.8.a Calculs sur les données

En général, trois méthodes sont employées pour le calcul du rapport de partition.

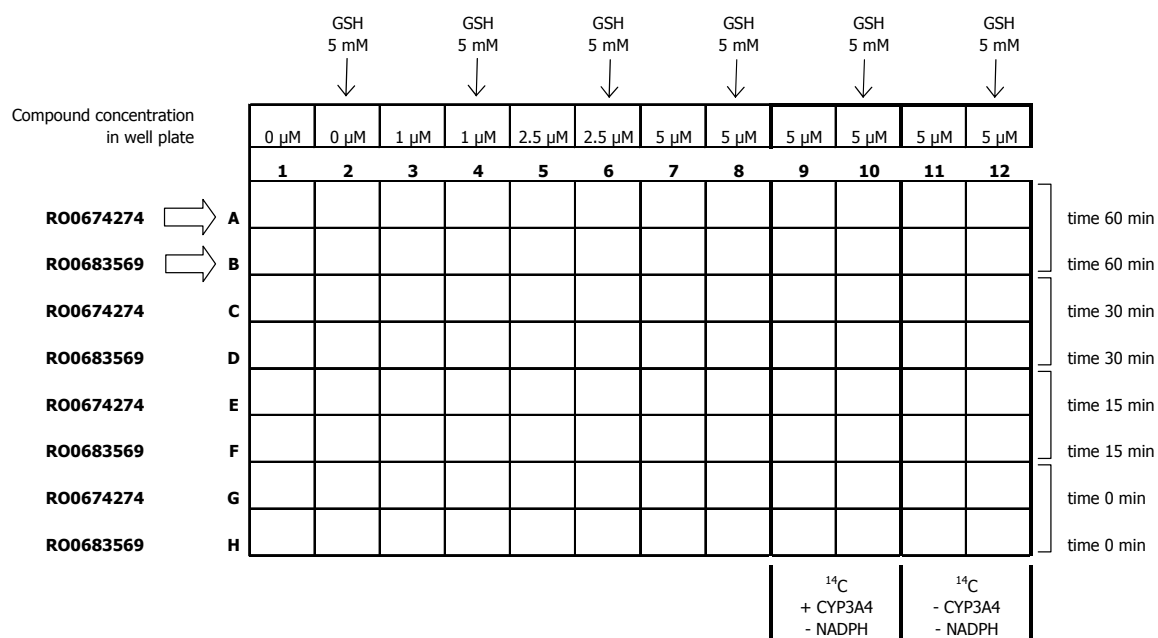
Quand il y a la libération d'un produit de métabolisme par le cytochrome, le rapport de partition est calculé comme le rapport entre la k_{cat} (constante cinétique de production du métabolite) et la k_{inact} (constante cinétique d'inactivation du cytochrome P450).

La deuxième méthode nécessite aussi la mesure de la quantité du produit de métabolisme.

Comme la méthode d'incubation, selon la procédure précédemment décrite, ne permet pas de quantifier le produit de la réaction enzymatique du cytochrome P450 sur l'inhibiteur, il faut employer une troisième méthode de calcul.



(a)



(b)

Figure 7.6 : Schéma général des durées d'incubation et de distribution des réactifs sur les plaques à 96 puits, pour la mesure de la stœchiométrie de liaison entre les composés radioactifs et CYP3A4. (a) Plaque sans contrôles négatifs ; (b) plaque avec contrôles négatifs (composé radioactif, avec CYP3A4 mais sans NADPH ou composé radioactif sans CYP3A4 et sans NADPH).

Le rapport de partition est calculé graphiquement : on représente sur un diagramme les valeurs de l'activité résiduelle après 60 minutes d'incubation (inactivation supposée complète) en fonction de la quantité de produit radioactif incubé par nanomole de cytochrome P450 (nmol ^{14}C / nmol CYP3A4). Le point où la droite d'extrapolation des données coupe l'axe des x (on utilise seulement les données correspondant aux valeurs basses du rapport nmol composé / nmol CYP3A4) donne le nombre moins un de cycles de métabolisme que le CYP3A4 est capable de effectuer avant l'inactivation.

7.9 Incubations pour l'identification des métabolites via LC-MS/MS (1)

7.9.a Préparation des réactifs

Le système régénérateur de NADPH est préparé avec 2,0 g de glucose phosphate (G_6P), 2,0 g de NADP et 1,33 g de magnésium chlorure hexa hydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) diluées dans 600 mL de tampon 0,1 M et conservé en fractions aliquotes de 9,0 mL à -80°C . Juste avant l'utilisation les fractions aliquotes sont décongelées et additionnées de glucose phosphate dehydrogenase (G_6PDH) (150 μL , 140 U/mg). Les concentrations finales des composées dans le mélange d'incubation sont les suivantes : G_6P 5,88 mM, NADPH 2.6 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6,54 mM, G_6PDH 0.5 mg/mL ou 67,5 U/mL.

Les deux composés sont incubés soit avec les microsomes de foie humain, que avec les cytochromes P450 recombinants. Un des composés (RO0674274) est incubé avec trois isoformes de cytochromes P450 : CYP2D6, CYP2C9 et CYP3A4. L'autre composé (RO0683569) est incubé seulement avec le CYP3A4.

Les deux substances sont capables d'inactiver seulement le CYP3A4, mais on réalise l'incubation aussi avec deux autres isoformes pour montrer que les métabolites réactifs ne sont produits que par le CYP3A4.

Dilutions des cytochromes P450 : les cytochromes sont employés à la concentration de 1,25 mg/mL de protéines, 0,5 mg/mL de protéines dans le mélange d'incubation.

Les composés à tester sont utilisés en solution 2 mM dans le DMSO.

7.9.b Préparation de la plaque

L'incubation est réalisée sur une plaque deep well (2 mL / puit) à 96 puits. Sur la même plaque on incube aussi deux blancs : un constitué seulement par cytochrome P450, et l'autre par de cytochrome P450 et composé, mais sans système régénérateur.

Pour faciliter la préparation de la plaque, deux mélanges d'incubation sont préparés auparavant.

Le mélange 1 (mix 1) est constitué par les cytochromes P450 à la concentration de 1,25 mg/mL de protéines. Le mélange 2 (mix 2) contient du cytochrome P450 dilué et chacun des composés à la concentration de 25 μ M.

Dans les puits du blanc 1 on mélange 500 μ L du mix 1 et 750 μ L de système régénérateur de NADPH. Dans les puits du blanc 2 on mélange 500 μ L du mix 2 et 750 μ L de tampon phosphate à pH 7,4. Dans les puits de l'incubation on mélange 500 μ L du mix 2 et 750 μ L de système régénérateur (figure 7.7).

7.9.c Incubation

A différents temps d'incubation, des fractions (250 μ L) du mélange d'incubation sont prélevées et transférées dans trois volumes de MeOH glacé pour arrêter la réaction et précipiter les protéines. Les temps d'incubation sont les suivantes : 0 - 30 - 60 - 120 minutes pour le CYP3A4 ; 0 - 30 - 60 minutes pour les CYP2D6 et CYP2C9.

MIX 1 + Reg. Sys.				MIX 2 + buffer				MIX 2 + Reg. Sys.					
Blank 1				Blank 2				Incubation					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
CYP3A4	A	t=0	30 min	60 min	120 min	t=0	30 min	60 min	120 min	t=0	30 min	60 min	120 min
	B												
CYP2C9	C	t=0	30 min	60 min		t=0	30 min	60 min		t=0	30 min	60 min	
	D												
CYP2D6	E	t=0	30 min	60 min		t=0	30 min	60 min		t=0	30 min	60 min	
	F												
	G												
	H												

Figure 7.7 : Schéma général d'incubation de chaque composé pour l'identification des métabolites par LC-MS/MS. Le composé RO0674274 est incubé avec les trois isoformes indiquées dans la figure ; le composé RO0683569 n'est incubé qu'avec le CYP3A4. L'incubation est arrêtée après différents temps par transfert de fractions aliquotes du mélange réactionnel dans trois volumes de MeOH glacé.

7.9.d Analyse des échantillons

Après centrifugation et séparation du surnageant, les échantillons sont analysés par LC-MS/MS. Les différents composés sont séparés par chromatographie en phase liquide (LC) sur une colonne Inertsil ODS-3, 125 / 2 mm, avec un flux de solvant constant de 0.25 mL/min.

Les solvants utilisés sont les suivants :

Mélange A : 90% acide formique (10 mM) : 10% acetonitrile ;

Mélange B : 90% acetonitrile : 10% acide formique (10 mM)

Ces deux mélanges sont utilisés selon le gradient décrit en table 7.3.

L'identification des métabolites est réalisée par MS/MS avec un spectromètre de masse Micromass Quattro Ultima avec CV 100 et CE 30 pour la fragmentation.

7.10 Incubation pour l'identification des métabolites via LC-MS/MS (2)

7.10.a Incubation avec CYP3A4 en présence de GSH

On a incubé les deux composés Roche (à concentration de 10 μ M dans le mélange d'incubation) avec le CYP3A4 recombinant, en présence de GSH (5 mM) pour détecter les métabolites et les produits de piégeage des métabolites réactifs.

Le CYP3A4 de E. Coli est utilisé à une concentration de 0,2 μ M de P450 dans le mélange d'incubation (volume total 1 mL).

L'incubation est initiée par addition du CYP3A4 et GSH en solution aux deux mélanges de système régénérateur de NADPH avec chacun des composés ; elle est arrêtée après 60 minutes à 37 °C et sous agitation. Les deux incubations sont arrêtées par transfert de chaque mélange d'incubation sur une petite colonne en polymère hydrophobe (Waters Oasis HLB 1cc Extraction Cartridges) précédemment rincée avec du méthanol et puis de l'eau. Les produits sont rincés avec 1 mL d'eau et puis élués par 1 mL de méthanol, qui est recueilli et séché sous un flux d'air chaud, et le résidu est dissolu dans un mélange H₂O : MeOH en proportion 3 :1 v/v.

Ces échantillons sont analysés par LC-MS/MS, selon la méthode décrite en section 7.10.c sur l'appareil Surveyor LCQ Advantage.

7.10.b Incubation avec microsomes de rat en présence de GSH

Les deux composés Roche ont été incubés avec des microsomes de foie de rat en présence de GSH (5 mM), pour détecter les produits de piégeage des métabolites réactifs et comparer les résultats avec les données obtenues par incubation avec le CYP3A4. On a utilisé un grand volume d'incubation (20 mL) pour obtenir des quantités majeures de métabolites, et peut être des

résultats plus claires par analyse LC-MS/MS, par rapport aux résultats obtenus avec 1 mL d'incubation. On n'a préféré travailler à basse concentration en substrat dans un grand volume plutôt qu'un petit volume d'incubation et des concentrations plus hautes des composés Roche afin de limiter l'inhibition compétitive du CYP3A4, qui peut diminuer excessivement la production de métabolites.

Les deux composés sont incubés à concentration de 10 μ M avec microsomes de rat ayant une concentration de 0,2 μ M en cytochromes P450 et en présence de GSH (5 mM) dans le mélange d'incubation.

Le temps d'incubation est de 60 minutes à température de 37 °C et sous agitation. L'incubation est arrêtée en transférant les tubes d'incubation dans la glace, et puis en les centrifugeant pour éliminer des précipités éventuels. Le surnageant est déposé sur un Sep-Pak Cartridges C₁₈-Waters (short body) préalablement rincée avec du MeOH et de l'eau. La colonne est rincée par 2 mL d'eau et puis éluée par du MeOH.

La phase méthanolique contenant les produits de métabolisation est ensuite évaporée sous un flux d'air chaud et le résidu est redissout dans un mélange de MeOH : H₂O en proportion de 3 :1 v/v.

Les deux solutions ainsi obtenues sont analysées par spectrométrie de masse en suivant la méthode décrite en section 7.10.c.

7.10.c Analyse des échantillons

Les métabolites et les adduits au GSH sont isolées par chromatographie en phase liquide (LC) sur une colonne Kromasil C18 3.5 μ 150*2, avec un flux de solvant constant de 0.20 mL/min.

Les solvants utilisés sont les suivants :

Mélange A : acide formique (1%) ; H₂O (97%) ; acetonitrile (2%)

Mélange B : acetonitrile (99%) : acide formique (1%)

Ces deux mélanges sont utilisés selon le gradient décrit en table 7.4 pour une durée totale de la méthode de 20 minutes.

L'identification des métabolites est réalisée par spectrométrie MS/MS en utilisant un spectromètre de masse LQC Advantage avec une énergie de collision de CE 35 pour la fragmentation en MS/MS.

Temps (min)	% A	% B
0.1	100	0
15.0	0	100
24.0	0	100
24.1	100	0
30.0	Stop	Stop

Table 7.3 : Description du gradient utilisé pour la séparation des métabolites par HPLC, avant leur identification par spectrométrie de masse en utilisant le spectromètre Micromass Ultima Quattro.

Temps (min)	A %	B %
0.00	90	10
1.00	90	10
11.00	20	80
12.50	20	80
13.00	90	10
19.00	90	10

Table 7.4 : Description du gradient utilisé pour la séparation des métabolites par HPLC, avant leur identification par spectrométrie de masse en utilisant le spectromètre à trappe ionique LCQ Advantage.

8. Bibliographie

8. Bibliographie

1. Akhlaghi F and Trull AK (2002) Distribution of cyclosporin in organ transplant recipients. *Clinical Pharmacokinetics* **41**:615-637
2. Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, Tyndale R, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV and Gonzales FJ (1989) Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *Journal of Biological Chemistry* **264**:10388-10395
3. Araya Z and Wikvall K (1999) 6- α -hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CAP3A4 in human liver microsomes. *Biochimica and Biophysica Acta* **1438**:47-54
4. Baer BR, Rettie AE and Hanna KR (2005) Bioactivation of 4-ipomeanol by CYP4B1: adduct characterization and evidence for an enedial intermediate. *Chemical Research in Toxicology* **18**(5):855-864
5. Back DJ, Stevenson P and Tjia JF (1989) Comparative effects of two antimycotic agents, ketoconazole and terbinafine on the metabolism of tolbutamide, ethynyloestradiol, cyclosporin and ethoxycoumarin by human liver microsomes in vitro. *British Journal of Clinical Pharmacology* **28**:166-170
6. Backman JT, Olkkola KT, Aranko K, Himberg J-J and Neuvonen PJ (1994) Dose of midazolam should be reduced during diltiazem and verapamil treatments. *British Journal of Clinical Pharmacology* **37**:221-225
7. Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE and Chenerey RJ (1995) Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica* **25**:261-270
8. Bell-Parikh LC and Guengerich FP (1999) Kinetics of cytochrome P450 2E1-catalyzed oxidation of ethanol to acetic acid via acetaldehyde. *Journal of Biological Chemistry* **274**:23833-23840
9. Beaune PH, Umbenhauer DR, Bork RW, Lloyd SR and Guengerich PF (1986) Isolation and sequence determination of a cDNA clone related to human cytochrome P-450

- nifedipine oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:8064-8068
10. Beaune P, Dansette PM, Mansuy D, Kiffel L, Finck M, Amar C, Leroux JP and Homberg JC (1987) Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**:551-555
11. Beaune PH and Lecoecur S (1997) Immunotoxicology of the liver: adverse reactions to drugs. *Journal of Hepatology* **26**:37-42
12. Bergman S, Kane D, Siegel IA and Ciancio S (1969) In vitro and in situ transfer of local anesthetics across the oral mucosa. *Archives of Oral Biology* **14**:35-43
13. Boek-Dohalska L, Hodek P, Sulc M and Stiborova M (2001) α -Naphthoflavone acts as activator and reversible or irreversible inhibitor of rabbit microsomal CYP3A6. *Chemico-Biological Interactions* **138**:85-106
14. Bolwell G and Dixon R (1986) Membrane-bound hydroxylases in elicitor-treated bean cells. Rapid induction of the synthesis of prolyl hydroxylase and a putative cytochrome P-450. *European Journal of Biochemistry* **159**:163-169
15. Bonate PL, Reith K and Weir S (1998) Drug interactions at the renal level - Implications for drug development. *Clinical Pharmacokinetics* **34**:375-404
16. Bondon A, Macdonald TL, Harris TM and Guengerich PF (1989) Oxidation of cycloalkylamines by cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* **264**:1988-1997
17. Borchardt RT (1981) Catechol O-Methyltransferase, in: *Methods in Enzymology* (Jakoby WB ed), vol. 77, pp 267-272, Academic Press Inc, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco
18. Borgeat P, Hamberg M and Samuelsson B (1976) Transformation of arachidonic acid and homo- γ -linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *Journal of Biological Chemistry* **251**:7816-7820
19. Bourdi M, Larrey D, Nataf J, Bernuau J, Pessayre D, Iwasaki M, Guengerich FP and Beaune PH (1990) Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450IA2. A specific marker of dihydralazine-induced hepatitis. *Journal of Clinical Investigations* **85**: 1967-1973

20. Bourdi M, Chen W, Peter RM, Martin JL, Buters JT, Nelson SD and Pohl LR (1996) Human cytochrome P450 2E1 is a major autoantigen associated with halothane hepatitis. *Chemical Research in Toxicology* **9**:1159-1166
21. Bromley L and Hayward A (1988) Cocaine absorption from the nasal mucosa. *Anaesthesia* **43**:356-358.
22. Brown RR, Miller JA and Miller EC (1954) The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **209**:211-222
23. Brown BRJ (1973) Hepatic microsomal enzyme induction. *Anesthesiology* **39**:178-187
24. Brueggemeier RW (2001) Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *American Journal of Therapeutics* **8**:333-344
25. Brueggemeier RW, Hackett JC and Diaz-Cruz ES (2005) Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Endocrine Reviews* **26**:331-345
26. Busby WF, Jr., Ackermann JM and Crespi CL (1999) Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition* **27**:246-249
27. Buters JTM, Korzekwa K, Kunze KL, Omata Y, Hardwick JP and Gonzales FJ (1994) CDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus. *Drug Metabolism and Disposition* **22**:688-692
28. Cacciari B, Pastorin G and Spalluto G (2003) Medicinal Chemistry of A2A Adenosine Receptor Antagonists. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **3**:403-411
29. Cappiello M, Franchi M, Giuliani L and Pacifici GM (1989) Distribution of 2-naphthol sulphotransferase and its endogenous substrate adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate in human tissues. *European Journal of Clinical Pharmacology* **37**:317-320
30. Carlini P, Bria E, Giannarelli D, Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Nisticó C, Di Cosimo S, Ruggeri EM, Milella M, Mottolese M, Terzoli E and Cognetti F (2005) New aromatase inhibitors as second-line endocrine therapy in postmenopausal patients with metastatic breast carcinoma. *Cancer* **104**:1335-1342
31. Cashman JR, Park S, Yang Z-C, Wrighton SA, Peyton JI and Benowitz NL (1992) Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of trans-nicotine N'-oxide. *Chemical Research in Toxicology* **5**:639-646

32. Cashman J, Park S, Yang Z, Washington C, Gomez D, Giacomini K and Brett C (1993) Chemical, enzymatic, and human enantioselective S-oxygenation of cimetidine. *Drug Metabolism and Disposition* **21**:587-597.
33. Cassidy J, Berner B, Chan K, John V, Toon S, Holt B and Rowland M (1993) Human transbuccal absorption of diclofenac sodium from a prototype hydrogel delivery device. *Pharmaceutical Research* **10**:126-129
34. Chen L-J, Hecht SS and Peterson LA (1995) Identification of cis-2-butene-1,4-dial as a microsomal metabolite of furan. *Chemical Research in Toxicology* **8**:903-906
35. Chen L-J, Hecht SS and Peterson LA (1997) Characterization of amino acid and glutathione adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chemical Research in Toxicology* **10**:866-874
36. Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ and Russell DW (2003) De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:38084-38093
37. Christen U, Jenö P and Gut J (1993) Halothane metabolism: the dihydrolipoamide acetyltransferase subunit of the pyruvate dehydrogenase complex molecularly mimics trifluoroacetyl-protein adducts. *Biochemistry* **32**:1492-1499
38. Chuang SS, Helvig C, Taimi M, Ramshaw HA, Collop AH, Amad M, White JA, Petkovic M, Jones G and Korczak B (2004) CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes ω - and (ω -1)-hydroxylation of fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:6305-6314
39. Chun J, Kent UM, Moss RM, Sayre LW and Hollenberg PF (2000) Mechanism-based inactivation of cytochromes P450 2B1 and P450 2B6 by 2-phenyl-2-(1-piperidinyl)propane. *Drug Metabolism and Disposition* **28**:905-911
40. Claude A (1946a) Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation - I. Problems, methods and preparation of extracts. *Journal of Experimental Medicine* **84**:51-60
41. Claude A (1946b) Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation - II. Experimental procedures and results. *Journal of Experimental Medicine* **84**:61
42. Collman JP, Brauman JI, Meunier B, Hayashi T, Kodadek T and Raybuck SA (1985) Epoxidation of olefins by cytochrome P-450 model compounds: kinetics and stereochemistry of oxygen atom transfer and origin of shape selectivity. *Journal of the American Chemical Society* **107**:2000-2005

43. Conney, A. H. (1967) Pharmacological implications of microsomal enzyme induction *Pharmacological Reviews* **19**(3): 317-366
44. Coon MJ, Blake RC, 2nd, Oprian DD and Ballou DP (1979) Mechanistic studies with purified components of the liver microsomal hydroxylation system: spectral intermediates in reaction of cytochrome P-450 with peroxy compounds. *Acta Biol Med Ger* **38**:449-458
45. Crespi CL, Penman BW, Steimel DT, Gelboin HV and Gonzales FJ (1991) The development of a human cell line stably expressing human CYP3A4: role in the metabolic activation of aflatoxin B1 and comparison to CYP1A2 and CYP2A3. *Carcinogenesis* **12**:355-359
46. Crespi CL, Miller VP and Penman BW (1997) Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Analytical Biochemistry* **248**:188-190
47. Crespi CL and Stresser DM (2000) Fluorometric screening for metabolism-based drug-drug interactions. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44**:325-331
48. Dalvie DK, Kalgutkar AS, Khojasteh-Bakht SC, Obach RS and O'Donnell JP (2002) Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings. *Chemical Research in Toxicology* **15**:269-299
49. Dansette PM, Thang DC, el Amri H and Mansuy D (1992) Evidence for thiophene-S-oxide as a primary reactive metabolite of thiophene in vivo: formation of a dihydrothiophene sulfoxide mercapturic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **186**:1624-1630
50. Dansette PM, Bertho G and Mansuy D (2005) First evidence that cytochrome P450 may catalyze both S-oxidation and epoxidation of thiophene derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications* In Press, Corrected Proof
51. Davidov ME (1981) Cutaneous administration of nitroglycerin in patients with angina pectoris. *Angiology* **32**:16-20.
52. Davis JD, Aarons L and Houston JB (1994) Relationship between enoxacin and ciprofloxacin plasma concentrations and theophylline disposition. *Pharm Res* **11**:1424-1428
53. Dawson, JH. and Sono M (1987) Cytochrome P-450 and chloroperoxidase: thiolate-ligated heme enzymes. Spectroscopic determination of their active site structures and mechanistic implications of thiolate ligation. *Chemical Reviews* **87**: 1255-1276

54. Delaforge M, Jaouen M and Mansuy D (1983) Dual effects of macrolide antibiotics on rat liver cytochrome P450 - Induction and formation of metabolite-complexes: a structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology* **32**:2309-2318
55. Delaforge M, Ioannides C and Parke DV (1985) Ligand-complex formation between cytochromes P-450 and P-448 and methylenedioxyphenyl compounds. *Xenobiotica* **15**:333-342
56. de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP and Beaune P (1990) Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **253**:387-394
57. de Ziegler D, Mattenberger C, Luyet C, Romoscanu I, Irion NF and Bianchi-Demicheli F (2005) Clinical use of aromatase inhibitors (AI) in premenopausal women. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **95**:121-127
58. Donato MT and Castell JV (2003) Strategies and Molecular Probes to Investigate the Role of Cytochrome P450 in Drug Metabolism: Focus On In Vitro Studies. *Clinical Pharmacokinetics* **42**:153-178
59. Dresser GK, Spence JD and Bailey DG (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clinical Pharmacokinetics* **38**:41-57
60. Eagling VA, Profit L and Back DJ (1999) Inhibition of the CYP3A4-mediated metabolism and P-glycoprotein-mediated transport of the HIV-1 protease inhibitor saquinavir by grapefruit juice components. *British Journal of Clinical Pharmacology* **48**:543-552
61. Eliasson E and Kenna JG (1996) Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothane hepatitis. *Molecular Pharmacology* **50**:573-582
62. Ervine CM, Matthew DE, Brennan B and Houston JB (1996) Comparison of ketoconazole and fluconazole as cytochrome P450 inhibitors. Use of steady-state infusion approach to achieve plasma concentration-response relationships. *Drug Metabolism and Disposition* **24**:211-215
63. Fasco MJ, Piper LJ and Kaminsky LS (1977) Binding of R and S warfarin to hepatic microsomal cytochrome P-450. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **182**:379-389
64. First MR, Schroeder TJ and Michael A (1993) Cyclosporine-ketoconazole interaction: long-term follow-up and preliminary results of a randomized trial. *Transplantation* **55**:1000-1004

65. Foroozesh M, Primrose G, Guo Z, Bell LC, Alworth WL and Guengerich FP (1997) Aryl Acetylenes as Mechanism-Based Inhibitors of Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase Enzymes. *Chemical Research in Toxicology* **10**:91-102
66. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P and Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacological Reviews* **46**:143-156
67. Furuya H, Meyer UA, Gelboin HV and Gonzales FJ (1991) Polymerase chain reaction-directed identification, cloning and quantification of human CYP2C18 mRNA. *Molecular Pharmacology* **40**:375-382
68. Gillam EM, Baba T, Kim BR, Ohmori S and Guengerich PF (1993) Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **305**:123-131
69. Gingell R and Bridges JW (1973) Intestinal azo-reduction and glucuronide conjugation of prontosil. *Xenobiotica* **3**:599-604
70. Gonzales FJ, Schmid BJ, Umeno M, McBride OW, Hardwick JP, Meyer UA, Gelboin HV and Idle JR (1988) Human P450PCN1: sequence, chromosome localization, and direct evidence through cDNA expression that P450PCN1 is nifedipine oxidase. *DNA* **7**:79-86
71. Gross AS, Goh YD, Addison RS and Shenfield GM (1999) Influence of grapefruit juice on cisapride pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **65**:395-401
72. Groves JT, McClusky GA, White RE and Coon MJ (1978) Aliphatic hydroxylation by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. Evidence for a carbon radical intermediate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **81**:154-160.
73. Groves JT and Watanabe Y (1986) On the mechanism of olefin epoxidation by oxo-iron porphyrins. Direct observation of an intermediate. *Journal of the American Chemical Society* **108**:507-508
74. Guengerich PF and Macdonald TL (1984) Chemical mechanisms of catalysis by cytochrome P-450: a unified view. *Accounts on Chemical Research* **17**:9-16
75. Guengerich PF, Martins MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T and Waxman DJ (1986) Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **261**:5051-5060
76. Guengerich PF (1987) Oxidative cleavage of carboxylic esters by cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* **262**:8459-8462.

77. Guengerich PF, Peterson LA and Böcker RH (1988) Cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation and carboxylic acid ester cleavage of Hantzsch pyridine esters. *Journal of Biological Chemistry* **263**:8176-8183
78. Guengerich FP (1995) Human Cytochrome P450 enzymes, in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano PR ed), pp 473-535, Plenum Press, New York
79. Guengerich PF (1997) Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Advances in Pharmacology* **43**:7-35
80. Guengerich PF (1999) Inhibition of drug metabolizing enzymes: molecular and biochemical aspects, in: *Handbook of drug metabolism* (Woolf TF ed), pp 203-227, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel
81. Guengerich FP (2001) Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* **14**:611-650
82. Haener T, Refaie MO and Muller-Enoch D (2004) Drug-drug interactions evaluated by a highly active reconstituted native human cytochrome P4503A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase system. *Arzneimittelforschung* **54**:78-83
83. Halliday RC, Jones BC, Smith DA, Kitteringham NR and Park BK (1995) An investigation of the interaction between halofantrine, CYP2D6 and CYP3A4: studies with human liver microsomes and heterologous enzyme expression systems. *British Journal of Clinical Pharmacology* **40**:369-378
84. Harrelson WG and Mason RP (1982) Microsomal reduction of gentian violet. Evidence for cytochrome P-450- catalyzed free radical. *Molecular Pharmacology* **22**:239-242
85. Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T and Funae Y (2002) Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **300**:298-304
86. Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2005) Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**:51-88
87. Hess S (2001) Recent advances in adenosine receptor antagonist research. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **11**(10):1533-1561.
88. Hille R and Sprecher H (1987) On the mechanism of action of xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **262**:10914-10917

89. Homberg JC, Andre C and Abuaf N (1984) A new anti-liver-kidney mirosome antibody (anti-LKM2) in tienilic acid-induced hepatitis. *Clinical and Experimental Immunology* **55**:561-570
90. Honig PK, Woosley RL, Zamani K, Conner DP and Cantilena JLR (1992) Changes in the pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine with concomitant administration of erythromycin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **52**:231-238
91. Hosaka F, Shiga T, Sakomura Y, Wakaumi M, Matsuda N and Kasanuki H (2002) Amiodarone distribution in human tissues after long-term therapy: a case of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart Vessels* **16**:154-156
92. Hosea NA, Miller GP and Guengerich PF (2000) Elucidation of distinct ligand binding sites for cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* **39**:5929-5939
93. Houston JB and Galetin A (2003) Progress towards prediction of human pharmacokinetic parameters from in vitro technologies. *Drug Metabolism Reviews* **35**:393-415
94. Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Oscarson M and Nebert DW (2000) Human cytochrome P450 (CYP) genes: recommendations for the nomenclature of alleles. *Pharmacogenetics* **10**:91-93
95. Ingelman-Sundberg M (2005) The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicology and Applied Pharmacology*:[Epub ahead of print]
96. Inoue T, Yasuda T, Suzuki S, Kishi T and Niwaguchi T (1986) The metabolism of 1-phenyl-2-(N-methyl-N-furfurylamino)propane (furfenorex) in the rat *in vivo* and *in vitro*. *Xenobiotica* **16**:109-121
97. Ishkawa T (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in Biochemical Sciences* **17**:463-468
98. Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H and Sugiyama Y (1998) Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacological Reviews* **50**:387-411
99. Ito K, Ogihara K, Kanamitsu S-I and Itoh T (2003) Prediction of the *in vivo* interaction between midazolam and macrolides based on *in vitro* studies using human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **31**:945-954

100. Jacob-Roetne R, Riemer C, Nettekoven M, Hunkeler W, Huber G and Kilpatrick G (1999) Amino-triazolopyridine derivatives, F. Hoffmann – La Roche, European Patent Application No. 99117578.7
101. Jalava KM, Olkkola KT and Neuvonen PJ (1997) Itraconazole greatly increases plasma concentrations and effects of felodipine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **61**:410-415
102. Jones DR, Gorski JC, Hamman MA, Mayhew BS, Rider S and Hall SD (1999) Diltiazem inhibition of cytochrome P-450 3A activity is due to metabolite intermediate complex formation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **290**:1116-1125
103. Katagiri M, Ganguli BN and Gunsalus IC (1968) A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry* **243**:3543-3546
104. Kenna JG, Martin JL, Satoh H and Pohl LR (1990) Factors affecting the expression of trifluoroacetylated liver microsomal protein neoantigens in rats treated with halothane. *Drug Metabolism and Disposition* **18**:788-793
105. Kennedy SW, Jones SP (1994) Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Analytical Biochemistry* **222**: 217-223
106. Kent UM, Juschyshyn MI and Hollenberg PF (2001) Mechanism-based inactivators as probes of cytochrome P450 structure and function. *Current Drug Metabolism* **2**:215-243
107. Kent UM, Mills DE, Rajnarayanan RV, Alworth WL and Hollenberg PF (2002) Effect of 17- α -ethynylestradiol on activities of cytochrome P450 2B (P450 2B) enzymes: characterization of inactivation of P450s 2B1 and 2B6 and identification of metabolites. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **300**:549-558
108. Khojasteh-Bakht SC, Chen W, Koenigs LL, Peter RM and Nelson SD (1999) Metabolism of (R)-(+)-pulegone and (R)-(+)-menthofuran by human liver cytochrome P-450s: evidence for formation of a furan epoxide. *Drug Metabolism and Disposition* **27**:574-580
109. Kim T, Chang S, Lee J, Hwang B, Takatsuto S, Yokota T and SK K (2004) Cytochrome P450-catalized brassinosteroid pathway activation through synthesis of castasterone and brassinolide in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* **65**:679-689
110. Klotz K-N, Kachler S, Lambertucci C, Vittori S, Volpini R and Cristalli G (2003) 9-Ethyladenine derivatives as adenosine receptor antagonists: 2- and 8-substitution results

- in distinct selectivities. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **367**:629-634
111. Koenigs LL, Peter RM, Thompson SJ, Rettie AE and Trager WF (1997) Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen. *Drug Metabolism and Disposition* **25**:1407-1415
112. Kolis SJ, Williams TH, Postma EJ, Sasso GJ, Confalone PN and Schwartz MA (1979) The metabolism of ¹⁴C-methoxsalen by the dog. *Drug Metabolism and Disposition* **7**:220-225
113. Koop DR (1992) Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB Journal* **6**:724-730
114. Koudriakova T, Iatsimirskaia E, Utkin I, Gangl E, Vouros P, Storozhuk E, Orza D, Marinina J and Gerber N (1998) Metabolism of the human immunodeficiency virus protease inhibitors indinavir and ritonavir by human intestinal microsomes and expressed cytochrome P4503A4/3A5: mechanism-based inactivation of cytochrome P4503A by ritonavir. *Drug Metabolism and Disposition* **26**:552-561
115. Koymans L, Moereels H and Vanden Bossche H (1995) A molecular model for the interaction between vorozole and other non-steroidal inhibitors and human cytochrome P450 19 (P450 aromatase). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **53**:191-197
116. Krishna DR and Klotz U (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clinical Pharmacokinetics* **26**:144-160
117. Kuwana Y, Shiozaki S, Kanda T, Kurokawa M, Koga K, Ochi M, Ikeda K, Kase H, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK and Jenner PG (1999) Antiparkinsonian activity of adenosine A2A antagonists in experimental models. *Adv Neurol* **80**:121-123
118. Lasker JM, Chen WB, Wolf I, Bloswick BP, Wilson PD and Powell PK (2000) Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of CYP4F2 and CYP4A11. *Journal of Biological Chemistry* **275**:4118-4126
119. Lawton MP, Cashman JR, Cresteil T, Dolphin CT, Elfarra AA, Hines RN, Hodgson E, Kimura T, Ozols J, Phillips IR, Philpot RM, Poulsen LL, Rettie AE, Shephard EA, Williams DE and Ziegler DM (1994) A Nomenclature for the Mammalian Flavin-Containing Monooxygenase Gene Family Based on Amino Acid Sequence Identities. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308**:254-257.

120. Lee PW and Neal RA (1978) Metabolism of methimazole by rat liver cytochrome P-450-containing monooxygenases. *Drug Metabolism and Disposition* **6**:591-600
121. Lewis DF, Eddershaw PJ, Goldfarb PS and Tarbit MH (1996) Molecular modeling of CYP3A4 from an alignment with CYP102: identification of key interactions between putative active site residues and CYP3A4-specific chemicals. *Xenobiotica* **26**:1067-1086
122. Lilly PD, Thornton-Manning JR, Gargas ML, Clewell HJ and Andersen ME (1998) Kinetic characterization of CYP2E1 inhibition in vivo and in vitro by the chloroethylenes. *Archives of Toxicology* **72**:609-621
123. Lin JH and Lu AY (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* **35**:361-390
124. Lin H-L, Kent UM and Hollenberg PF (2002) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17 α -ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **301**:160-167
125. Lopez-Garcia MP, Dansette PM and Mansuy D (1994) Thiophene derivatives as new mechanism-based inhibitors of cytochromes P-450: inactivation of yeast-expressed human liver cytochrome P-450 2C9 by tienilic acid. *Biochemistry* **33**:166-175
126. Lu AY, Somogyi A, West S, Kuntzman R and Conney AH (1972) Pregnenolone-16 α -carbonitrile: a new type of inducer of drug-metabolizing enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **152**:457-462
127. Lu, A. Y. (1976). "Liver microsomal drug-metabolizing enzyme system: functional components and their properties." *Fed. Proc.* **35**(13): 2460-2463
128. Lyon ES and Jakoby WB (1981) Arylamine N-Methyltransferase, in: *Methods in Enzymology* (Jakoby WB ed), vol. 77, pp 263-266, Academic Press Inc, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco
129. Ma B, Prueksaritanont T and Lin JH (2000) Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A. *Drug Metabolism and Disposition* **28**:125-130
130. Mailman RB, Kulkarni AP, Baker RC and Hodgson E (1974) Cytochrome P-450 difference spectra. Effect of chemical structure on type II spectra in mouse hepatic microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **2**:301-308

131. Mansuy D and Renaud J-P (1995) Heme-thiolate proteins different from Cytochromes P450 catalyzing Monooxygenations, in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano PR ed), pp 537-574, Plenum Press, New York
132. Martens S and Forkmann G (1999) Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* hybrids. *Plant Journal* **20**:611-618
133. Martinez C, Albet C, Agundez JA, Herrero E, Carrillo JA, Marquez M, Benitez J and Ortiz JA (1999) Comparative in vitro and in vivo inhibition of cytochrome P450 CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4 by H2-receptor antagonists. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **65**:369-376
134. Matsumoto S, Hirama T, Matsubara T, Nagata K and Yamazoe Y (2002) Involvement of CYP2J2 in the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole. *Drug Metabolism and Disposition* **30**:1240-1245
135. Mayhew BS, Jones DR and Hall SD (2000) An in vitro model for predicting in vivo inhibition of cytochrome P4503A4 by metabolic intermediate complex formation. *Drug Metabolism and Disposition* **28**:1031-1037
136. Melet A, Assrir N, Jean P, Lopez-Garcia PM, Marques-Soares C, Jaouen M, Dansette PM, Sari MA and Mansuy D (2003) Substrate selectivity of human cytochrome P450 2C9: importance of residues 476, 365, and 114 in recognition of diclofenac and sulfaphenazole and in mechanism-based inactivation by tienilic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **409**:80-91
137. Merry C, Barry MG, Mulcahy F, Ryan M, Heavey, Jane, Tija JF, Gibbons SE, Breckenridge AM and Back DJ (1997) Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with zidovudine in HIV-infected patients. *AIDS* **11**:F29-F33
138. Mico BA, Branchflower L and Pohl LR (1983) Formation of electrophilic chlorine from carbon tetrachloride - involvement of cytochrome P-450. *Biochemical Pharmacology* **32**:2357-2359
139. Mills D, Kent UM and Hollenberg PF (1999) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B6 by 17- α -ethynylestradiol. *ISSX Proceedings, 9th North American ISSX Meeting* **15**:97
140. Mimura M, Baba T, Yamazaki H, Ohmori S, Inui Y, Gonzales FJ, Guengerich FP and Shimada T (1993) Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **21**:1048-1056

141. Miners JO and Birkett DJ (1996) The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. *General Pharmacology: The Vascular System* **27**:245-249
142. Mitani F and Horie S (1969) Studies on P-450. VI. The spin state of P-450 solubilized from bovine adrenocortical mitochondria. *Journal of Biochemistry* **66**:139-149
143. Monahan BP, Ferguson CL, Killeavy ES, Lloyd BK, Troy J and Cantilena JLR (1990) Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA* **264**:2788-2790
144. Mori A, Shindou T, Ichimura M, Nonaka H and Kase H (1996) The role of adenosine A2a receptors in regulating GABAergic synaptic transmission in striatal medium spiny neurons. *Journal of Neuroscience* **16**:605-611
145. Mullins ME, Horowitz BZ, Linden DH, Smith GW, Norton RL and Stump J (1998) Life-threatening interaction of mibefradil and β -blockers with dihydropyridine calcium channel blockers. *JAMA* **280**:157-158
146. Murakami, K. and H. S. Mason (1967). "An electron spin resonance study of microsomal Fe_x." *The Journal of Biological Chemistry* **242**(6): 1102-1110
147. Murray M (1997) Drug mediated inactivation of cytochrome P450. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* **24**:465-470
148. Nakajima M, Suzuki M, Yamaji R, Takashina H, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T (1999) Isoform selective inhibition and inactivation of human cytochrome P450s by methylenedioxyphenyl compounds. *Xenobiotica* **29**:1191-1202
149. Narasimhulu S, Cooper DY and Rosenthal O (1965) Spectrophotometric properties of a triton-clarified 21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes. *Life Sciences* **4**:2101-2107
150. Naritomi Y, Teramura Y, Terashita S and Kagayama A (2004) Utility of microtiter assays for human cytochrome P450 inhibition studies in drug discovery: application of simple method for detecting quasi-irreversible and irreversible inhibitors. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **19**:55-61
151. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzales FJ, Guengerich PF, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin a, Phillips IR, Sato R and Waterman MR (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**:1-11
152. Nebert DW and Nelson DR (1991) P450 gene nomenclature based on evolution, in: *Cytochrome P450 - Methods in Enzymology* (Waterman MR and Johnson EF eds), pp 3-11, Academic Press Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto

153. Nebert DW and Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet* **360**:1155-1162.
154. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**:1-42
155. Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369**:1-10
156. Ochi M, Koga K, Kurokawa M, Kase H, Nakamura J and Kuwana Y (2000) Systemic administration of adenosine A(2A) receptor antagonist reverses increased GABA release in the globus pallidus of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. *Neuroscience* **100**:53-62
157. Odds FC, Milne LJ, Gentles JC and Ball EH (1980) The activity in vitro and in vivo of a new imidazole antifungal, ketoconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **6**:97-104
158. Olkkola KT, Aranko K, Luurila H, Hiller A, Saarnivaara L, Himberg J-J and Neuvonen PJ (1993) A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **53**:298-305
159. Ortiz de Montellano PR (1988) Suicide substrates for drug metabolizing enzymes: mechanisms and biological consequences, in: *Progress in Drug Metabolism* (Gibson GG ed), pp 99-148, Taylor & Francis, London
160. Ortiz de Montellano PR (1991) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450: isolation and characterization of N-alkyl heme adducts, in: *Cytochrome P450 - Methods in Enzymology* (Waterman MR and Johnson EF eds), pp 533-540, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto
161. Oscarson, M. and M. Ingelman-Sundberg (2002). "CYPalleles: a web page for nomenclature of human cytochrome P450 alleles." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **17**(6): 491-495
162. Pacifici GM, Franchi M, Bencini C, Repetti F, Di Lascio N and Muraro GB (1988) Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica* **18**:849-856
163. Palovaara S, Kivistö KT, Tapanainen P, Manninen P, Neuvonen PJ and Laine K (2000) Effect of an oral contraceptive preparation containing ethinylestradiol and gestodene on

- CYP3A4 activity as measured by midazolam 1'-hydroxylation. *British Journal of Clinical Pharmacology* **50**: 333-337.
164. Parmar D and Burka LT (1993) Studies on the interaction of furan with hepatic cytochrome P-450. *Journal of Biochemistry and Toxicology* **8**:1-9
165. Peng JZ, Remmel RP and Sawchuk RJ (2004) Inhibition of murine cytochrome P4501A by tacrine: in vitro studies. *Drug Metabolism and Disposition* **32**:805-812
166. Perloff MD, von Moltke LL, Court MH, Kotegawa T, Shader RI and Greenblatt DJ (2000) Midazolam and triazolam biotransformation in mouse and human liver microsomes: relative contribution of CYP3A and CYP2C isoforms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **292**:618-628
167. Pessayre D, Descatoire V, Kostantinova-Mitcheva M, Wandscheer J-C, Cobert B, Level R, Benhamou J-P, Jaouen M and Mansuy D (1981) Self-induction by triacetyloleandomycin of its own transformation into a metabolite forming a stable 456 nm-absorbing complex with cytochrome P-450. *Biochemical Pharmacology* **30**:553-558
168. Peterson LA, Naruko KC and Predecki DP (2000) A reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial, is mutagenic in the ames assay. *Chemical Research in Toxicology* **13**:531-534
169. Peterson LA, Cummings ME, Vu CC and Matter BA (2005) Glutathione Trapping to Measure Microsomal Oxidation of Furan to cis-2-butene-1,4-dial. *Drug Metabolism and Disposition* **33**:1453-1458
170. Petkova-Andonova M, Imaishi H and Ohkawa H (2002) CYP92B1, a cytochrome P450, expressed in petunia flower buds, that catalyzes monooxydation of long-chain fatty acids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **66**:1819-1828
171. Pinna A, Volpini R, Cristalli G and Morelli M (2005) New adenosine A2A receptor antagonists: actions on Parkinson's disease models. *European Journal of Pharmacology* **512**:157-164
172. Plastaras JP, Guengerich PF, Nebert DW and Marnett LJ (2000) Xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 convert prostaglandine endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *Journal of Biological Chemistry* **275**:11784-11790.
173. Polasek TM, Elliot DJ, Lewis BC and Miners JO (2004) Mechanism-based inactivation of human cytochrome P4502C8 by drugs in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **311**:996-1007

174. Poppers PJ, Levin W and Conney AH (1975) Effect of 3-methylcholanthrene treatment on phenacetin O-dealkylation in several inbred mouse strains. *Drug Metabolism and Disposition* **3**:502-506
175. Poucher SM, Keddie JR, Singh P, Stoggall SM, Caulkett PW, Jones G and Coll MG (1995) The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine A2a selective adenosine receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology* **115**:1096-1102
176. Poulos T, Finzel B, Gunsalus I, Wagner G and Kraut J (1985) The 2.6-A crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* **260**:16122-16130
177. Poulsen LL and Ziegler DM (1979) The liver microsomal FAD-containing monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **254**:6443-6455
178. Poupon R, Homberg JC, Abuaf N, Petit J, Bodin F and Darnis F (1980) Tienilic acid-induced hepatitis associated with liver/kidney microsomal antibody. *Nouvelle Presse Medicale* **9**:1881-1884
179. Pritsos CA and Gustafson DL (1994) Xanthine dehydrogenase and its role in cancer chemotherapy. *Oncology Research* **6**:477-481
180. Rating D, Jager-Roman E, Nau H, Kuhn W and Helge H (1983) Enzyme induction in neonates after fetal exposure to antiepileptic drugs. *Pediatric Pharmacology (New York)* **3**:209-218
181. Ravichandran KG, S. BS, Hasermann CA, Peterson JA and Deisenhofer J (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **261**:731-736
182. Ravindranath V, Burka LT and Boyd MR (1984) Reactive metabolites from the bioactivation of toxic methylfurans. *Science* **224**:884-886
183. Remmer H and Merker HJ (1963) Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum: association with drug-metabolizing enzymes. *Science* **142**:1657-1658
184. Renaud J-P, Cullin C, Pompon D, Beaune PH and Mansuy D (1990) Expression of human liver cytochrome P450 IIIA4 in yeast - A functional model for the hepatic enzyme. *European Journal of Biochemistry* **194**:889-896
185. Rendic S and Di Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews* **29**:413-580

186. Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes : human P450 metabolism data *Drug Metabolism Reviews* **34**(1) : 83-448
187. Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN and Baillie TA (1987) Cytochrome P-450-catalyzed formation of δ -4-VPA, a toxic metabolite of valproic acid. *Science* **235**:890-893
188. Rettie AE and Fisher MB (1999) Transformation Enzymes: Oxidative; non-P450, in: *Handbook of drug metabolism* (Woolf TF ed), pp 131-150, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
189. Riegelman S, Loo J and Rowland M (1968) Concept of a volume of distribution and possible errors in evaluation of this parameter. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **57**:128-133
190. Riley RJ, Smith G, Wolf CR, Cook VA and Leeder JS (1993) Human antiendoplasmic reticulum autoantibodies produced in aromatic anticonvulsant hypersensitivity reactions recognize rodent CYP3A proteins and similarly regulated human P450 enzyme(s). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **191**:32-40
191. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ and Weiss M (2002) Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* **41**:751-790
192. Romiti P, Giuliani L and Pacifici GM (1992) Interindividual variability in the N-sulphation of desipramine in human liver and platelets. *British Journal of Clinical Pharmacology* **33**:17-23
193. Roschlau G, Baumgarten R and Fengler JD (1990) Die hydralazin Hepatitis. Morphologische und klinische Kriterien für die Diagnose. *Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie* **136**:127-134
194. Sahali-Sahly Y, Balani SK, Lin JH and Baillie TA (1996) In vitro studies on the metabolic activation of the furanopyridine L-754,394, a highly potent and selective mechanism-based inhibitor of cytochrome P450 3A4. *Chemical Research in Toxicology* **9**:1007-1012
195. Sakurai, H. and T. Yoshimura (1985) Models for coordination site of cytochrome P-450, characterization of hemin-thiolato complexes with S, O, and N donor ligands by electronic absorption. *Journal of Inorganic Biochemistry* **24**(2): 75-96

196. Satoh H, Gillette JR, Davies HW, Schulick RD and Pohl LR (1985) Immunochemical evidence of trifluoroacetylated cytochrome P-450 in the liver of halothane-treated rats. *Molecular Pharmacology* **28**:468-474
197. Satoh H, Martin BM, Schulik AH, Christ DD, Kenna JG and Pohl LR (1989) Human anti-endoplasmic reticulum antibodies in sera of patients with halothane-induced hepatitis are directed against a trifluoroacetylated carboxyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:322-326
198. Schenkman JB, Remmer H and Estabrook RW (1967) Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molecular Pharmacology* **3**:113-123
199. Schenkman JB, Cinti DL, Orrenius S, Moldeus P and Kraschnitz R (1972) The nature of the reverse type I (modified type II) spectra change in liver microsomes. *Biochemistry* **11**:4243-4251
200. Schenkman JB, Sligar SG and Cinti DL (1981) Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmacology and Therapeutics* **12**:43-71
201. Sekkarie MA (1997) Torsades de pointes in two chronic renal failure patients treated with cisapride and clarithromycin. *American Journal of Kidney Disease* **30**:437-439
202. Shinn AF (1992) Clinical relevance of cimetidine drug interactions. *Drug Safety* **7**:245-267
203. Sharma U, Roberts ES, Kent UM, Owens SM and Hollenberg PF (1997) Metabolic inactivation of cytochrome P4502B1 by phencyclidine: immunochemical and radiochemical analyses of the protective effects of glutathione. *Drug Metabolism and Disposition* **25**:243-250
204. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich PF (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **270**:414-423
205. Shou M, Grogan J, Mancewicz JA, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV and Korzekwa KR (1994) Activation of CYP3A4: evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry* **33**:6450-6455
206. Silverman RB (1995) Mechanism-Based Enzyme Inactivators, in: *Methods in Enzymology*, pp 240-283, Academic Press, Inc.
207. Sirica AE (1996) Biliary proliferation and adaptation in furan-induced rat liver injury and carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* **24**:90-99

208. Smith G, Wolf CR, Deeni YY, Dawe RS, Evans AT, Comrie MM, Ferguson J and Ibbotson SH (2003) Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. *The Lancet* **361**:1336-1343
209. Srivastava PK, Yun C-Y, Beaune P, Ged C and Guengerich FP (1991) Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes. *Molecular Pharmacology* **40**:69-79
210. Szklarz GD and Halpert JR (1997) Molecular modeling of cytochrome P450 3A4. *Journal of Computer Aided Molecular Design* **11**:265-272
211. Taniguchi H, Imai Y and Sato R (1984) Role of the electron transfer system in microsomal drug monooxygenase reaction catalyzed by cytochrome P-450. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **232**:585-596
212. Testa B (1995) Oxidations catalyzed by various oxidases and monooxygenases, in: *The metabolism of drugs and other xenobiotics: biochemistry of redox reactions* (Testa B and Caldwell J eds), pp 298, Academic Press, London.
213. Thomassen D, Knebel N, Slattery JT, McClanahan RH and Nelson SD (1992) Reactive intermediates in the oxidation of menthofuran by cytochromes P-450. *Chemical Research in Toxicology* **5**:123-130
214. Traylor TG and Miksztal AR (1987) Mechanisms of hemin-catalyzed epoxidations: electron transfer from alkenes. *Journal of the American Chemical Society* **109**:2770-2774
215. Tsai WC, Tsai LM and Chen JH (1997) Combined use of astemizole and ketoconazole resulting in torsade de pointes. *Journal of the Formosa Medical Association* **96**:144-146
216. Tukey RH and Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**:581-616
217. Turner NA, Doyle WA, Ventom AM and Bray RC (1995) Properties of rabbit liver aldehyde oxidase and the relationship of the enzyme to xanthine oxidase and dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* **232**:646-657
218. Valadon P, Dansette PM, Girault JP, Amar C and Mansuy D (1996) Thiophene sulfoxides as reactive metabolites: formation upon microsomal oxidation of a 3-arylthiophene and fate in the presence of nucleophiles in vitro and in vivo. *Chemical Research in Toxicology* **9**:1403-1413

219. van Dyke RA and Gandolfi AJ (1976) Anaerobic release of fluoride from halothane. *Drug Metabolism and Disposition* **4**:40-44
220. van Meerten E, Verveij J and Schellens HM (1995) Antineoplastic agents - Drug interactions of clinical significance. *Drug Safety* **12**:168-182
221. Venkatakrishnan K and Obach SR (2005) In vitro-in vivo extrapolation of CYP2D6 inactivation by paroxetine: prediction of nonstationary pharmacokinetics and drug interaction magnitude. *Drug Metabolism and Disposition* **33**:845-852
222. Vermeulen NPE (1996) Role of metabolism in chemical toxicity, in: *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects*, pp 29-53, CRC Press
223. Vermilion JL, Ballou DP, Massey V and Coon MJ (1981) Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Journal of Biological Chemistry* **256**:266-277
224. von Moltke LL, Durol ALB, Duan SX and Greenblatt DJ (2000) Potent mechanism-based inhibition of human CYP 3A in vitro by amprenavir and ritonavir: comparison with ketoconazole. *European Journal of Clinical Pharmacology* **56**:259-261
225. Vu CB, Pan D, Peng B, Kumaravel G, Smits G, Jin X, Phadke D, Engber T, Huang C, Reilly J, Tam S, Grant D, Hetu G and Petter RC (2005) Novel diamino derivatives of [1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine as potent and selective adenosine A2a receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **48**:2009-2018
226. Waley SG (1980) Kinetics of suicide substrates. *Biochemical Journal* **185**:771-773
227. Waley SG (1985) Kinetics of suicide substrates - Practical procedures for determining parameters. *Biochemical Journal* **227**:843-849
228. Walsh C (1982) Suicide substrates: mechanism-based enzyme inactivators. *Tetrahedron* **38**:871-909
229. Walsky RL and Obach RS (2004) Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metabolism Disposition* **32**:647-660
230. Walton B, Simpson BR, Strunin L, Doniach D, Perrin J and Appleyard AJ (1976) Unexplained hepatitis following halothane. *British Medical Journal* **1**:1171-1176.
231. Wang Y-H, Jones DR and Hall SD (2004) Prediction of cytochrome P450 3A inhibition by verapamil enantiomers and their metabolites. *Drug Metabolism and Disposition* **32**:259-266
232. Watkins PB (1990) Role of cytochrome P450 in drug metabolism and hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease* **10**:235-250

233. Waxman DJ, Attisano C, Guengerich PF and Lapenson DP (1988) Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6- β -hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **263**:424-436
234. Waxman DJ, Lapenson DP, Aoyama T, Gelboin HV, Gonzales FJ and Korzekwa K (1991) Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **290**:160-166
235. Weaver R-, Graham KS, Beattie IG and Riley RJ (2003) Cytochrome P450 inhibition using recombinant proteins and mass spectrometry/multiple reaction monitoring technology in a cassette incubation. *Drug Metabolism and Disposition* **31**:955-966
236. Weisiger RA and Jakoby WB (1981) Thiol S-Methyltransferase, in: *Methods in Enzymology* (Jakoby WB ed), vol 77, pp 257-262, Academic Press Inc., New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco
237. Wester MR, Yano JK, Schoch GA, Yang C, Griffin KJ, Stout CD and Johnson EF (2004) The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with fluriprofen at 2.0-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* **279**:35630-35637
238. Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, Otter C, Andersson TB, Johansson I, Edwards RJ, Boobis AR and Ingelman-Sundberg M (2003) Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* **31**:755-761
239. Whysner JA, Ramseyer J and Harding BW (1970) Substrate-induced changes in visible absorption and electron spin resonance properties of adrenal cortex mitochondrial P450. *Journal of Biological Chemistry* **245**:5441-5449
240. Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF and McRee DE (2000) Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *Journal of Inorganic Biochemistry* **81**:183-190
241. Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Matak Vinkovic D and Jhoti H (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424**:464-468
242. Williams PA, Cosme J, Matak Vinkovic D, Ward A, Angove HC, Day PJ, Vonnrhein C, Tickle IJ and Jhoti H (2004) Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metyrapone and Progesterone. *Science* **305**:683-686

243. Williams AJ, Hurst SI, Bauman J, Jones BC, Hyland R, Gibbs JP, Obach RS and Ball SE (2003) Reaction phenotyping in drug discovery: moving forward with confidence? *Current Drug Metabolism* **4**:527-534
244. Wirth PJ, Bettis CJ and Nelson WL (1976) Microsomal metabolism of furosemide. Evidence for the nature of the reactive intermediate involved in covalent binding. *Molecular Pharmacology* **12**:759-768
245. Wolf SB, Sanchez-Ramos L and Kaunitz AM (2005) Sublingual misoprostol for labor induction, a randomized clinical trial. *Obstetrics and Gynecology* **105**:364-371
246. Woodcroft KJ, Webb CD, Yao M, Weedon AC and Bend JR (1997) Metabolism of the cytochrome P450 mechanism-based inhibitor N-benzyl-1-aminobenzotriazole to products that covalently bind with protein in guinea pig liver and lung microsomes: comparative study with 1-aminobenzotriazole. *Chemical Research in Toxicology* **10**:589-599
247. Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR and Zeldin DC (1996) Molecular Cloning and Expression of CYP2J2, a Human Cytochrome P450 Arachidonic Acid Epoxygenase Highly Expressed in Heart. *Journal of Biological Chemistry* **271**:3460-3468
248. Yamamoto T, Suzuki A and Kohno Y (2003) High-throughput screening to estimate single or multiple enzymes involved in drug metabolism: microtitre plate assay using a combination of recombinant CYP2D6 and human liver microsomes. *Xenobiotica* **33**:823-839
249. Yamamoto T, Suzuki A and Kohno Y (2004) High-throughput screening for the assessment of time-dependent inhibitions of new drug candidates on recombinant CYP2D6 and CYP3A4 using a single concentration method. *Xenobiotica* **34**:87-101
250. Yamazaki H, Inui Y, Guengerich FP and Shimada T (1992) Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* **13**:1789-1794
251. Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD and Johnson EF (2004) The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* **279**:38091-38094
252. Yasui N, Otani K, Kaneko S, Ohkubo T, Osanai T, Sugawara K, Chiba K and Ishizaki T (1996) A kinetic and dynamic study of oral alprazolam with and without erythromycin in humans: in vivo evidence for the involvement of CYP3A4 in alprazolam metabolism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **59**:514-519

253. Yeo KR and Yeo WW (2001) Inhibitory effects of verapamil and diltiazem on simvastatin metabolism in human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology* **51**:461-470
254. Yin H, Racha J, Li S-Y, Olejnik N, Satoh H and Moore D (2000) Automated high throughput human CYP isoform activity assay using SPE-LC/MS method: application in CYP inhibition evaluation. *Xenobiotica* **30**:141-154
255. Zeigler-Johnson C, Friebe T, Walker AH, ang Y, Spangler E, Panossian S, Patacsil M, Aplenc R, Wein AJ, Malkowicz SB and Rebbeck TR (2004) CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Research* **64**:8461-8167
256. Zhang KE, Naue JA, Arison B and Vyas KP (1996) Microsomal metabolism of the 5-lipoxygenase inhibitor L-739,010: evidence for furan bioactivation. *Chemical Research in Toxicology* **9**:547-554
257. Zhou S, Koh HL, Gao Y, Gong ZY and Lee EJ (2004a) Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sciences* **74**:935-968
258. Zhou S, Chan E, Yong Lim L, Boelsterli UA, Li CS, Wang J, Zhang Q, Huang M and Xu A (2004b) Therapeutic drugs that behave as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Current Drug Metabolism* **5**:415-442
259. Zhou S, Chan E, Duan W, Huang M and Chen Y-Z (2005) Drug Bioactivation Covalent Binding to Target Proteins and Toxicity Relevance. *Drug Metabolism Reviews* **37**:41-213
260. Zhou J, Zhang J and Xie W (2005) Xenobiotic Nuclear receptor-mediated regulation of UDP-glucuronosyl-transferases. *Current Drug Metabolism* **6**:289-298
261. Zilly W, Breimer D and Richter E (1977) Stimulation of drug metabolism by rifampicin in patients with irrhosis or cholestasis measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance. *European Journal of Clinical Pharmacology* **11**:287-293
262. Zocchi C, Ongini E, Conti A, Monopoli A, Negretti A, Baraldi PG and Dionisotti S (1996) The non-xanthine heterocyclic compound SCH 58261 is a new potent and selective A2a adenosine receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **276**:398-404
263. Zomorodi K and Houston JB (1995) Effect of omeprazole on diazepam disposition in the rat: in vitro and in vivo studies. *Pharmacological Research* **12**:1642-1646

Résumé

L'inhibition des cytochromes P450 (CYPs) humains est l'un des mécanismes les plus fréquents à l'origine d'interactions médicamenteuses. L'inhibition des CYPs peut être réversible ou irréversible. L'inhibition irréversible provient souvent de l'activation d'un médicament, par action des CYPs, en métabolite réactif qui se lie stablement au site actif de l'enzyme, provoquant une inactivation permanente. Ce processus est appelé « inhibition suicide ».

L'inhibition irréversible implique souvent la formation d'une liaison covalente entre le métabolite et l'enzyme, qui crée une protéine hapténisée qui peut, dans certains cas, provoquer une réponse auto-immunitaire.

Il est donc important d'étudier les mécanismes d'inhibition des CYPs par de nouvelles molécules à visées thérapeutiques le plus tôt possible dans leur processus de développement.

Dans cette thèse on propose une stratégie pour éviter le développement de médicaments qui pourraient provoquer l'inhibition suicide des CYPs dans les patients.

- 1) Après compilation de la littérature, on a créé une base de données de toutes les molécules responsables d'inhibition suicide des CYPs. Cette base met en évidence les structures les plus souvent responsables de l'inactivation et permet de donner une alerte pour une structure nouvelle.
- 2) On a mis au point et validé une nouvelle méthode fluorimétrique, pour déterminer quantitativement l'inhibition dépendant du temps du CYP3A4, utilisable à moyen débit. Grâce à cet outil, on a établi des relations structure-activité pour un groupe de composés furaniques différemment substitués.
- 3) Deux composés de cette série, qui montraient une inhibition suicide nette du CYP3A4 ont été étudiés plus complètement à l'aide de molécules radiomarquées au ^{14}C . Ces molécules sont activées en intermédiaires réactifs capables de se fixer de façon covalente aux protéines. Leur métabolisme a été partiellement analysé.

Proposition de mots de clés

Cytochrome P450 ; inhibition suicide ; méthode à haut débit ; base de données ; furane.

Summary

The inhibition of human cytochrome P450s (CYPs) is one of the most common mechanisms which can lead to drug-drug interactions. The inhibition of CYPs can be reversible or irreversible. Irreversible inhibition usually derives from activation of a drug by CYPs into a reactive metabolite, which tightly binds to the enzyme active site, leading to a long lasting inactivation. This process is called “suicide inhibition”.

The irreversible inactivation usually implies the formation of a covalent bond between the metabolite and the enzyme, which can lead to hapten formation and can in some cases trigger an autoimmune-response.

For these reasons it is of utmost importance to study the mechanism of the CYP inhibition of new potential drugs as early as possible during the drug discovery process.

In this thesis, a strategy to avoid the development of drugs that might cause CYP suicide inhibition in patients is proposed.

First, a database with all the chemical entities responsible for suicide inhibition of human and animal CYPs, was compiled, after a wide literature search. The most common substructures considered responsible for CYP inactivation are highlighted, and named structural alerts.

Second, a new screening assay, based on fluorescence, to quantitatively assess time dependent inhibition of CYP3A4 was set and validated. By running this assay, structure-time dependent inhibition relationships were derived for a group of compounds, differently substituted on the furan ring, a potentially dangerous substructure.

Third, two compounds containing a furan ring, -a structural alert- and causing time dependent inhibition on CYP3A4, were used for a series of more specific tests (also using ^{14}C labelled derivatives). The activity of these two compounds as suicide inhibitors of CYP3A4 was demonstrated.